

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**Señalización/reparación del daño en el DNA
producido por la exposición a nanopartículas
de cobalto**

**Signaling/repair of DNA damage caused by
exposure to cobalt nanoparticles.**

Autor: Sara De La Llama Van den Eynde

Director: Dr. Íñigo Casafont Parra

Santander, Junio 2020

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	5
PALABRAS CLAVE.....	6
1. OBJETIVOS.....	6
2. METODOLOGÍA.....	6
3. INTRODUCCIÓN.....	7
3.1. NANOMATERIALES.....	7
3.1.1. DEFINICIÓN.....	7
3.1.2. CLASIFICACIÓN.....	7
3.2. USO DE NANOMATERIALES EN ARTÍCULOS DE CONSUMO.....	10
3.3. USO DE NANOMATERIALES EN EL SECTOR BIOMÉDICO Y FARMACÉUTICO.....	15
3.4. RIESGOS EN LA EXPOSICIÓN A NANOMATERIALES.....	17
3.5. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN Y REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL DNA.....	29
4. RESULTADOS.....	34
4.1. EL COBALTO EN LOS ARTÍCULOS DE CONSUMO.....	34
4.2. TOXICIDAD PRODUCIDA POR LA EXPOSICIÓN A NANOPARTÍCULAS DE COBALTO.....	35
4.2.1. COBALTO: GENOTOXICIDAD Y DAÑO OXIDATIVO.....	36
4.2.2. LAS NANOPARTÍCULAS DE COBALTO.....	36
4.3. PREVENCIÓN.....	44
5. DISCUSIÓN.....	47
6. CONCLUSIONES.....	49
7. AGRADECIMIENTOS.....	50
8. BIBLIOGRAFÍA.....	50

ABREVIATURAS

NRK: Células epiteliales tubulares renales de riñón de ratón

MEF: Fibroblastos Embrionarios de ratón

ROS: Especies reactivas de oxígeno

LDH: Lactato Deshidrogenasa

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

SWCNT: Nanotubos de carbono de paredes simples

MWNT: Nanotubos de carbono de pared múltiple

NM, NMs: Nanomaterial, nanomateriales

NP, NPs: Nanopartícula, Nanopartículas

GIT: Tracto Gastro-Intestinal

SPION: Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro

CoNPs: Nanopartículas de cobalto

CoC: Prótesis de Cerámica sobre cerámica

MoM: Prótesis de Metal sobre Metal

MoP: Prótesis de Metal sobre polietileno reticulado

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP

GPX: Glutación peroxidasa

NADPH, NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAC: N-acetilcisteína

L-AA: L- ácido ascórbico

CA: Aberración cromosómica

MN: Micronúcleos

GPT: Guanina fosforibosiltransferasa

RESUMEN

Desde hace relativamente poco tiempo el auge de la Nanotecnología ha permitido el desarrollo de nuevos artículos de consumo y biomédicos cuya fabricación se fundamenta en la presencia de NMs. En la actualidad, sabemos que los NMs más utilizados son los de plata, seguidos por el carbono y titanio para la elaboración de productos destinados a la industria del automóvil, electrónica, cosmética, agroalimentaria y sector biomédico entre otros muchos. Dentro del campo de la medicina, merece la pena destacar la utilización de CoNPs (junto con otros metales) en el diseño de medios de contraste, técnicas de imagen como la RMN, tratamientos contra el cáncer como la hipertermia magnética y prótesis articulares.

El hecho de que estos materiales tengan unas propiedades únicas asociadas a su tamaño las confiere un perfil muy atractivo a la vez que potencialmente peligroso. La presente revisión bibliográfica permite repasar cuatro aspectos relativos a las CoNPs de los distintos productos: vías de exposición e internalización, toxicidad ambiental (liberándose por suelo, agua, aire y dañando animales y plantas) y toxicidad humana local y sistémica, mecanismos de prevención (normativas, reglamentos y recomendaciones), así como sistemas de reparación del daño celular (NAC, L-AA, Melatonina y otros antioxidantes).

Uno de los principales objetivos, a su vez, será repasar los distintos estudios in vivo e in vitro que relacionan la toxicidad (sistémica, sobre el DNA, local) de las prótesis (con aleaciones de CoNPs) en sujetos portadores de las mismas, debido a la demanda creciente de estas cirugías en una población muy envejecida.

ABSTRACT

Relatively recently, the rise of nanotechnology has allowed the development of new consumer and biomedical devices whose manufacture is based on the presence of NMs.

Currently, we know that the most widely used NMs are silver, followed by carbon and titanium for the manufacture of products for the automotive, electronics, cosmetics, agri-food and biomedical sectors, among many others.

Within the medical field, it is worth highlighting the use of CoNPs (along with other metals) in the design of contrast media, imaging techniques such as NMR, cancer treatments such as magnetic hyperthermia, and joint prostheses.

The fact that these materials have unique properties associated with their size confers them a very attractive and potentially dangerous profile.

The present bibliographic assay allows us to review four aspects related to the CoNPs of the different products: routes of exposure and internalization, environmental toxicity (freeing itself from soil, water and air, damaging plants and animals) and local and systemic human toxicity, prevention mechanisms (normative, regulations and recommendations) as well as cell damage repair systems (NAC, L-AA, Melatonin and other antioxidants).

One of the main objectives, at the same time, will be to review the different in vivo and in vitro studies that relate the toxicity (systemic, DNA, local) of the prostheses (with alloys of CoNPs) in subjects wearing them, due to the increasing demand for these surgeries in a very aging population.

PALABRAS CLAVE

DNA damage, nanoparticles, cobalt, prosthesis, environment, agriculture, consumption.

1. OBJETIVOS

En este trabajo se ha realizado una revisión para, por un lado, ver la actuación de las Nanopartículas de cobalto (CoNPs) a nivel celular y poder explicar los mecanismos de señalización de las vías que producen daño a nivel del DNA, así como los fenómenos de reparación posibles que puedan servir para utilizarlos como medidas preventivas.

Por otro lado se ha intentado ver el proceso inverso, en el caso de prótesis, analizando los fracasos de éstas para establecer su causa y ver la posible toxicidad ocurrida.

Asimismo, otro punto de la revisión es el de buscar nuevos métodos de fabricación de nanopartículas que resulten inocuas.

2. METODOLOGÍA

Se han revisado un total de 33 artículos de investigación localizados en la base de datos PubMed. La mayoría de los trabajos de investigación se han desarrollado sobre animales de experimentación mediante el uso de células de riñón de ratón (NRK), células de tejido pulmonar de ratones transgénicos delta Gpt, fibroblastos de ratones salvajes (MEF Ogg1 (+ / +)) y (MEF Ogg1 (-) (/) (-)), o en monocitos (células U937). Otros estudios se han llevado a cabo directamente sobre humanos. Estudiando el resultado de la exposición de nanopartículas de cobalto en diferentes concentraciones y tiempo en estas células.

Los métodos empleados llevaban como finalidad la detección de toxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad, para ello se han investigado diversos marcadores, como son la generación de ROS, ensayos de fuga de LDH para detectar citotoxicidad, análisis de transferencia Western para investigar las alteraciones en la expresión de proteínas asociadas con la apoptosis. La genotoxicidad se detectó mediante un ensayo de cometa. Asimismo, la rotura de la doble hélice de DNA se vio por el aumento de focos H2AX de histona fosforilada por inmunofluorescencia.

Los empleados en seres humanos, fundamentalmente se basan tanto en trabajos epidemiológicos, como en estudios que analizan las ROS que activan las vías de señalización MAPK y la expresión de citocinas.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. NANOMATERIALES

3.1.1. DEFINICIÓN

Existen diversas acepciones del término Nanomaterial (NM). Por un lado, según la recomendación de la Comisión Europea del 18 de octubre de 2011 relativa a la definición de NM, los NMs se definen como “un material natural, incidental o manufacturado que contiene partículas, en un estado no unido o como agregado o aglomerado y donde, para el 50% o más de las partículas en la distribución de tamaño numérico, una o más las dimensiones externas están en el rango de tamaño 1–100 nm” (1) (4). Por otro lado, se puede definir como “aquellos materiales con propiedades morfológicas, entre 1 y 100 nm en al menos una de sus dimensiones” (3). Podemos indicar también que los NMs son materiales compuestos en su totalidad o en parte, de nano-objetos, que les confieren propiedades mejoradas o específicas de la dimensión nanométrica. La necesidad de contar con un consenso en la terminología relacionada con esta materia ha conducido a la creación de comités europeos nacionales e internacionales para normalizar los conceptos (ISO TC 229 “nanotechnologies”; CEN TC 352 “nanotechnologies”; AEN/GET 15 “nanotechnologies”) y normas y documentos publicados al respecto, como el siguiente: UNE-CEN ISO/TS 27687:2010 Nanotecnologías. Terminología y definiciones para nano-objetos. Nanopartícula, nanofibra y nanoplaca. (ISO/TS 27687:2008).

Entendido el concepto de NM podemos introducir el concepto de Nanotecnología señalándola como la ciencia que se encarga del control y explotación de materiales a escala nano para sintetizar, diseñar y estudiar nuevos sistemas funcionales y aparatos que se obtienen al manipular materiales a escala molecular y atómica. La manipulación de estos materiales les confiere propiedades totalmente distintas a materiales en una escala superior.

3.1.2. CLASIFICACIÓN

Al igual que sucedía al definir los distintos términos referidos a NM es posible encontrar diversos tipos de clasificaciones.

Una de ellas agrupa los NMs en base a su estructura (3):

-Materiales Nanoreforzados: Materiales creados por la incorporación de un nanomaterial a una matriz orgánica o mineral para modificar sus propiedades (por ejemplo, plata en los textiles o dióxido de titanio en los protectores solares).

-Materiales Nanoestructurados en superficie: Materiales revestidos por nanopartículas o nanocapas.

-Materiales Nanoestructurados en volumen: Materiales cuya estructura interna ya es en sí misma nanométrica (por ejemplo, porosidad).

Otro tipo de clasificación se basa en la forma del NM:

-Nanotubos de Carbono. Consisten en tubos formados por una o varias láminas de grafeno enrolladas y que pueden ser SWCNT o MWNT.

-Nanocápsulas. Estructuras de morfología esférica y hueca.

-Nanocables. Estructura alargada de pocas micras de longitud que presenta un grosor nanométrico.

-Fullerenos. Estructura basada en el carbono que tiene una geometría en forma de elipse, tubo o anillo.

-Quantum dots o puntos cuánticos. Estructura cristalina de tamaño nanométrico que puede transformar la luz.

Un tercer tipo de clasificación divide a los NMs en dos grupos según su fuente de exposición (7): **Fuentes naturales y fuentes antropogénicas de NMs.** La mayoría de los nanomateriales existentes en el medio ambiente, se consideran dentro del primer grupo y se forman por procesos naturales como tormentas de polvo (principal fuente de NMs en el medio ambiente), incendios forestales y erupciones volcánicas.

La liberación de NMs al medio ambiente por fuentes antropogénicas puede ser a su vez, intencionada por medio de la descarga a ríos, suelos y plantas de los productos de ingeniería humana elaborados con dichos materiales, o por la liberación no intencionada de NMs por la quema de madera y cera.

Un cuarto tipo clasifica a los NMs según su composición (4):

-Basados en metales: se incluyen los puntos cuánticos (cristales semiconductores formados por miles de átomos), NPs de oro, plata y óxidos de metales.

-Basados en carbono: formados principalmente por carbono y suelen adoptar formas esféricas huecas o elipsoides (Fullerenos), Cilíndricas (Nanotubos), Láminas (Grafeno), etc.

-Dendrimeros: polímeros “nano” formados desde unidades ramificadas que son tridimensionales y con cavidades internas que se pueden adaptar para desempeñar funciones químicas específicas.

-Nanocompuestos: compuestos mezcla de NPs con otras o con materiales de mayor tamaño (un ejemplo serían las nanoarcillas).

Concluyendo con la clasificación de los NMs se aporta una última clasificación que permite ordenarlos según la estructura en la que los materiales se encuentran nanodimensionados (11):

-Materiales con sus tres dimensiones a escala nanométrica: se incluyen las NPs (nano-objetos con sus tres dimensiones nano) y fullerenos.

-Materiales con dos dimensiones en escala nanométrica: Nanotubos y nanofibras.

-Materiales con una única dimensión en escala nanométrica: por ejemplo, los nanodiscos.

Con todo lo comentado podemos recalcar que existe una gran variedad de formas de clasificar los nanomateriales. Esto nos da una idea de la complejidad del asunto y el inmenso abanico de estudios que se han realizado al respecto.

Los nanomateriales se introducen en el cuerpo humano principalmente por medio del Sistema Respiratorio, la Piel y el Sistema Gastrointestinal y, desde ahí, se dispersan por el resto de los tejidos y órganos. Las principales células implicadas en la internalización de los NMs son las células epiteliales pulmonares, del sistema gastro-intestinal, endoteliales, sanguíneas, neuronas y macrófagos. Por medio de la inhalación, estas partículas penetran en el tracto respiratorio, en donde los NMs solubles pueden depositarse en el epitelio y luego pasar a la sangre y al sistema linfático. Sin embargo, los NMs insolubles (formados por carbono, oro, plata, etc.) se pueden depositar en el pulmón tras una larga y continuada exposición. Existe en el momento actual una gran discusión respecto a los mecanismos de absorción de los NMs a través de la piel, llegando a la conclusión de que esos NMs pueden penetrar por el estrato córneo sobre todo cuando se flexiona la piel.

Los NMs introducidos por vía digestiva suelen pertenecer a la industria de la alimentación y de los medicamentos (*FIGURA 1*).

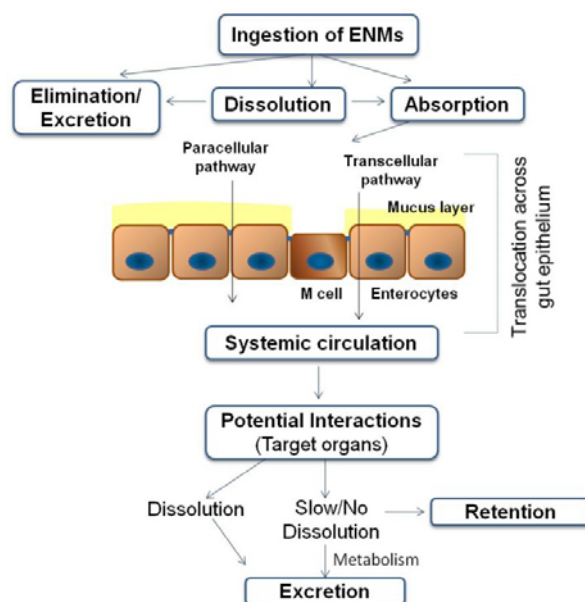


Figura 1. El destino de los ENMs relacionados con los alimentos en el GIT (modificado de Cockburn et al). (6)

3.2. USO DE NANOMATERIALES EN ARTÍCULOS DE CONSUMO

En términos generales, para comprender la extensa utilización de los NMs como artículos de consumo habitual por el ser humano, en el año 2005 el Centro Internacional Woodrow Wilson comenzó un Proyecto de Nanotecnología Emergente (PEN) en donde se aportaba un inventario de todos los productos de consumo que contenían NMs o que incluían procesos de producción centrados en la nanotecnología (8). Este inventario (denominado Base de Datos Woodrow Wilson) ha incorporado sucesivamente y año tras año nuevos productos en sus registros y aporta datos sobre el nombre del producto, el país de origen, fabricante, empresa, detalles sobre el producto y fecha de actualización. En el año 2005 se citaron en dicha base de datos, cincuenta y cuatro productos. Estos se vieron incrementados 24 veces en seis años, hasta 1317 productos en 2011. Fueron EE. UU, seguido de Europa y Asia oriental, los principales sitios de origen de dichos productos. Posteriormente a este año, se adoptó un nuevo “Inventario de Nanoprodutos de Consumo”, fruto del trabajo en equipo del Centro Internacional Woodrow Wilson, el Centro de la Universidad Estatal de Nanotecnología Sostenible y el Instituto Politécnico de Virginia. Este nuevo inventario recoge datos pertenecientes a la previa base de datos del PEN ([http://www. nanotechproject.org/cpi/](http://www.nanotechproject.org/cpi/)).

De forma paralela, en el marco europeo, en 2010 el Instituto de Salud Pública Nacional y Medio Ambiente de los Países Bajos (RIVM) lanzó un nuevo inventario que contenía 858 productos basados en NMs. En una comparativa establecida entre ambas bases de datos (la de Woodrow Wilson y RIVM), se valoraron los sectores más relevantes en el empleo de NMs, coincidiendo ambos inventarios en que los sectores preponderantes eran, en este orden, salud y belleza, hogar y jardinería y el sector del automóvil en tercer lugar (*FIGURA 2- Comparativa de bases de datos Woodrow Wilson y RIVM*).

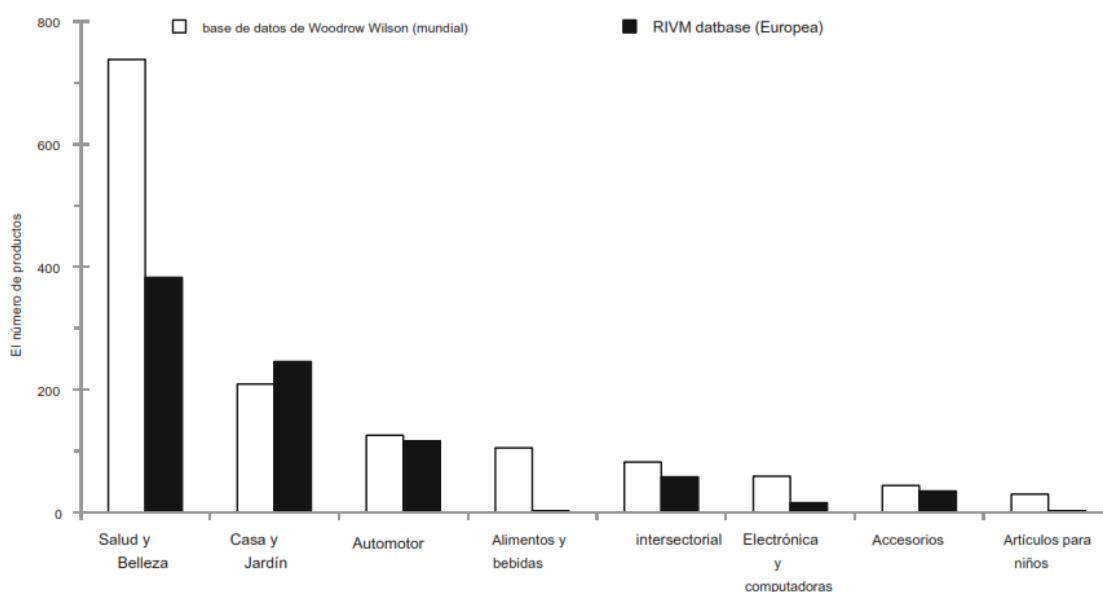


Figura 2. Número de productos de cada categoría en: datos en todo el mundo de la base de datos Woodrow Wilson y los datos europeos de la base de datos RIVM. (8)

Uno de los problemas que apreciamos en estas bases de datos es que cada una aporta cifras distintas respecto al número de productos que contenían. En concreto se considera muy notable la discrepancia por ejemplo en el espectro de alimentos y bebidas en donde se recogen números muy inferiores de productos con NMs producidos en Europa respecto a Asia o Norteamérica. Esto indica que el continente europeo ha sido más conservador en la incorporación de NMs en dicho terreno. Asimismo, las dos bases de datos mencionadas incluyen contenidos relacionados con el tipo de NMs más empleados en los productos de consumo, acordando en ambos casos que los productos con NMs de plata son los más utilizados, seguidos de los de carbono y titanio (**FIGURA 3**).

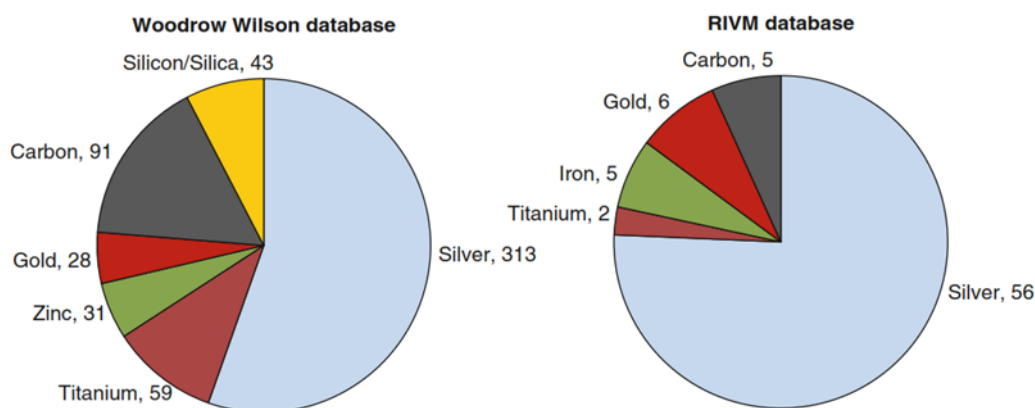


Figura 3. Distribución de los principales NMs relacionados con productos de consumo. Base de datos Woodrow Wilson y datos europeos de la base de datos RIVM. (8)

Dejando a un lado las bases de datos comentadas, se puede afirmar que en nuestros días existen más de 1.600 productos en el mercado que contienen estos nanomateriales (11). La *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) se centra en trece NMs elegidos por ser los más representativos en el consumo (ya que sería imposible detallar todos los existentes):

1. Fullerenos (C60).
2. Nanotubos de carbono
3. Nanopartículas de plata.
4. Nanopartículas de hierro.
5. Carbón negro.
6. Dióxido de titanio.
7. Óxido de aluminio.
8. Óxido de cerio.
9. Óxido de cinc.
10. Dióxido de Silicio.

11. Poliestireno.

12. Dendrímeros.

13. Nanoarcillas

Una vez expuestos los aspectos generales de la aplicación de estos materiales “nano” en la industria del consumo pasamos a repasar con detalle, aportando modelos concretos, sus usos en el mercado. Para empezar (3), uno de sus principales campos de actuación (ya que estos materiales confieren resistencia y ligereza), sería el de la industria del automóvil, el espacio y la aeronáutica. En este punto, tenemos claros ejemplos como sensores para el rendimiento del motor, aditivos para el combustible diésel, detectores de hielo en alas de aviones, pinturas exteriores para coches y barnices anti-ralladuras creados con NPs de sílice, neumáticos reciclables, etc.

Otro terreno de aplicación es la electrónica y comunicación, en donde su uso lo encontramos en teléfonos inalámbricos, pantallas táctiles y planas, células solares, procesadores en miniatura y memorias de elevada densidad.

En la industria química se emplea en la fabricación de textiles y revestimientos antibacterianos, tinta invisible con NPs de oro y plata, nano-imanés para ordenadores de alta capacidad de almacenamiento y potencia, membranas de separación para el tratamiento de aguas, aislamiento térmico, vidrios auto limpiantes, polvos de cerámica, pigmentos, etc.

En el sector farmacéutico y biomédico, los NMs se emplean para fabricar principios activos de fármacos inteligentes órgano-específicos, superficies para implantes, tratamientos anticancerígenos (ej. fármacos enfocados a la destrucción de células tumorales por hipertermia), regeneración de tejido óseo, vacunas orales y kits de diagnóstico. Se utilizan también en la fabricación de nano-transportadores en terapia génica, sensores en miniatura, nano-implantes y NPs presentes en prótesis.

Dentro del sector energético su empleo se centra en la fabricación de ventanas inteligentes, mejores aislamientos, nuevas baterías o células fotovoltaicas.

En el medio-ambiente su uso está destinado principalmente a la generación de agua pura a través de agua del mar, membranas no tóxicas, pesticidas y fertilizantes nuevos, NPs de dióxido de manganeso para realizar una fotosíntesis artificial, NMs para disminuir la emisión de CO₂, etc.

La utilización de NMs en la industria cosmética está ampliamente extendida, podemos así encontrar estos materiales en la fabricación de pasta de dientes más abrasivas (creadas con NPs de zirconio y sílice), maquillajes más resistentes, filtros solares y bronceadores transparentes.

Tampoco se escapa el uso de la nanotecnología en la industria militar. En este sector, la tecnología “nano” se invierte en construir textiles luminosos, sistemas de vigilancia, orientación y para el lanzamiento de misiles, nuevos armamentos, detectores químicos y de armas biológicas entre otros.

Por último, señalar en este apartado el uso de los NMs en la industria agroalimentaria (4) (6) clasificándolos en tres apartados:

-NMs orgánicos: se trata de nano esferas, micelas o liposomas que suelen transportar en su interior principalmente aditivos, tales como vitaminas o colorantes y también pueden transportar pesticidas y medicamentos de uso veterinario. Son sustancias orgánicas que, al estar en escala nano, pueden mejorar la absorción y biodisponibilidad.

-NMs combinados orgánico/inorgánico: éstos añaden funciones (como la antimicrobiana) a la matriz. Un ejemplo son las nanoarcillas utilizadas en envases de alimentos.

-NMs inorgánicos: son principalmente óxidos de metales (hierro, calcio, magnesio, selenio) para la elaboración de envases alimentarios.

Aunque, en la actualidad, el grupo orgánico es el mayoritario en la industria agroalimentaria, los nuevos estudios se centran en el desarrollo de los inorgánicos. Del mismo modo, las principales aplicaciones que existen en la industria agrícola se resumen en tres apartados (detallados en la *TABLA 1* y nombres de productos comerciales en *TABLA 2*):

-Producción agrícola: cuya misión es la de optimizar pesticidas (para que no se acumulen en la planta y resulten tóxicos para la misma), desarrollar fertilizantes más potentes, gestionar residuos agrarios, purificación de agua y limpieza del suelo.

-Procesado de alimentos, suplementos alimenticios y aditivos: se centra en la elaboración de aditivos que logren mejores sabores y productos más saludables. Los principales aditivos empleados son óxido de silicio (anti-aglomerante), óxido de titanio (mejora el sabor de alimentos que no son blancos y el color en productos blancos como los lácteos) y óxido de hierro (usado como colorante).

-Materiales en contacto con los alimentos: en este caso, los NMs son útiles para crear materiales o envases más resistentes a determinadas temperaturas, más flexibles, con propiedades antimicrobianas (las más estudiadas para este fin son las NPs de plata), recubrimientos que repelan la suciedad, etc.

Campo de aplicación y sus potenciales aplicaciones

Agricultura:

- Nano-cápsulas para una mayor eficiencia de distribución de pesticidas, fertilizantes y otros agroquímicos.
- Nanomateriales para detección de animales y plantas patógenos.
- Nanomateriales para identificar conservación, seguimiento y localización.

Alimentos y Piensos:

- Nano-cápsulas para mejorar la dispersión, biodisponibilidad y absorción de nutrientes.
- Nanomateriales como potenciador de color.
- Nano-encapsulado como potenciadores de sabor.
- Nanotubos y nanopartículas como agentes de gelificación y viscosificantes.
- Nanopartículas para una unión y extracción selectiva de productos químicos y agentes patógenos de los alimentos.

Envases de alimentos:

- Nanopartículas para detectar sustancias químicas de patógenos alimentarios.
- Nanosensores biodegradables para monitorizar temperatura y humedad.
- Nanoarcillas y nano-films como materiales de barrera para prevenir el deterioro y la absorción de oxígeno.
- Nanopartículas para recubrimientos superficiales antimicrobianos y antifúngicos.

Suplementos alimentarios:

- Suspensión de nanopartículas como antimicrobianos.
- Nano-encapsulación para la entrega selectiva de nutraceuticos.

Tabla 1. Potenciales aplicaciones del uso de NMs en la industria agroalimentaria. (4)

Nombre del producto	Subcategoría del producto	Empresa	País de origen	Nanomaterial	Forma/ Dimensión	Localización del nanomaterial
Papel de aluminio de toppits	Almacenamiento	Melitta	Alemania	Carbón	NPs	Suspendido en un sólido
Botella de plástico	Almacenamiento	Voridian	EE.UU.	Arcilla	Nd	Suspendido en un sólido
Frigorífico Daewoo®	Almacenamiento	Daewoo	Korea	Plata	NPs de 15-300 nm	En la superficie
24 horas Microactive® CoQ10	Suplemento	Genceutic Naturals	EE.UU.	Calcio y Magnesio	Nd	Suspendido en un sólido
Aquanova® Novasol®	Suplemento	Aquanova	Alemania	Nano micelas	NPs de 30 nm	Suspendido en un líquido
MesoCopper®	Suplemento	Purest Colloids, Inc.	EE.UU.	Cobre	NPs de 20 nm	Suspendido en un líquido
MesoGold®	Suplemento	Colloids for life LLC	EE.UU.	Oro	NPs de 0.65 nm	Suspendido en un líquido
LifePak® Nano	Suplemento	Pharmanex	EE.UU.	Cobre, silicio y óxido de zinc	NPs	Suspendido en un líquido
Tabla de cortar Nano- Silver	Cocina	Pro-Idee GmbH & Co. KG	Alemania	Plata	NPs	En la superficie
Utensilios de cocina anti-bacterianos	Cocina	Nano Care Technology, Ltd..	China	Plata	NPs	Nd
Aceite de canola activo	Aditivo	Shemen Industries	Israel	Nano micelas	NPs	Suspendido en un líquido
m&m's	Aditivo	Mars	EE.UU.	TiO ₂	NPs	Suspendidas en un sólido
Old el Paso Taco Seasoning Mix	Aditivo	General Mills	EE.UU.	SiO ₂	NPs	Polvo
Envases Airlight	Envase	e.Window	Corea del Sur	Plata	NPs	Nd
Envases Everin	Envase	NewLife Co. LTD.	Corea del Sur	Plata	NPs	Nd

Tabla 2. Ejemplos de productos comercializados con NMs en la industria agroalimentaria (www.centerforfoodsafety.org). Muestra algunos ejemplos de productos comerciales con NMs. (4)

3.3. USO DE NANOMATERIALES EN EL SECTOR BIOMÉDICO Y FARMACÉUTICO

A continuación, se desarrollarán más extensamente otros campos de aplicación de los NMs en medicina y farmacia, como son los nanofármacos utilizados en la terapia contra el cáncer y los componentes de las prótesis (principalmente en este trabajo se hará referencia a las prótesis de cadera).

En el campo de la medicina, el término de nanofármaco (2), surgió por primera vez en el año 2000 y fue acuñado por el Instituto Nacional de Salud (NIH), constituyéndose al mismo tiempo un programa federal para la investigación y desarrollo de la nanociencia, la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (NNI). El NIH asimismo definió la nanotecnología como “la comprensión y el control de la materia en dimensiones entre aproximadamente 1 y 100 nm, donde los

fenómenos únicos permiten aplicaciones novedosas que no son factibles cuando se trabaja con materiales a granel o incluso con átomos o moléculas individuales". Según esta definición, los verdaderos NMs son aquellos sintetizados prácticamente a partir de cualquier sustancia química y que, teniendo una variedad infinita de tamaños y formas, cuentan con propiedades únicas a nivel óptico, magnético o eléctrico. Volviendo al concepto de nanofármaco podemos señalar que fueron definidos por *Rivera et al* (2) como "productos farmacéuticos diseñados a nanoescala", es decir, productos farmacéuticos donde el NM desempeña el papel terapéutico fundamental o agrega funcionalidad adicional al compuesto anterior. Actualmente, se considera que existen dos requisitos básicos para que un producto sea considerado nanofarmacéutico, en primer lugar, que el fármaco esté fabricado por nanoingeniería y, en segundo lugar, que el NM utilizado dote de propiedades únicas o una actividad terapéutica principal al fármaco activo de base.

Muchos años antes de que se creara el término de nanofármaco, ya se venían utilizando otros medicamentos que utilizaban sistemas coloidales y liposomas, ambos de tamaño nanométrico. En la actualidad, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha aprobado cuarenta y tres compuestos nanofarmacéuticos para uso comercial (quince de ellos ya fueron aprobados antes del 2000 y sólo cuatro de ellos después del 2010). Se pueden distinguir distintos tipos de medicamentos dentro de los cuarenta y tres aprobados para tal fin: Liposomas (aunque no todos se consideran nanofármacos), nano formulaciones no liposomales basadas en lípidos, proteínas y péptidos PEGilados, nano formulaciones basadas en polímeros, conjugados de proteína-fármaco (Abraxane-albúmina portadora de paclitaxel-), nano formulaciones basadas en tensioactivos, nano cristales (medicamento insoluble en agua y sin ningún tipo de nano portador o excipiente), virosomas y NPs de metal (SPION).

Dentro de las aplicaciones en el campo de la medicina resulta imprescindible abordar la utilización de NMs en la fabricación de implantes metálicos protésicos (en concreto esta revisión contemplará en los sucesivos apartados referencias específicas a las CoNPs liberadas a partir de prótesis fundamentalmente de cadera) (9).

El tratamiento para los pacientes con patologías agudas o crónicas de cadera (fracturas u osteólisis terminal) termina normalmente en la sustitución total o parcial de los componentes de dicha articulación para reconstruir las partes, mejorar la movilidad y la función y erradicar el dolor. Con el tiempo se han ido desarrollando nuevas técnicas y diseños para implementar el tratamiento, pero en un principio, la artroplastia de cadera convencional utilizaba para la fabricación de sus componentes materiales como el polietileno. Debido a la corta supervivencia de estas prótesis por el aflojamiento aséptico y la osteólisis, se han ido analizando nuevos materiales que consiguen superar estos inconvenientes y lograr una mayor supervivencia del implante. Estas prótesis de posterior creación son prótesis de Cerámica sobre Cerámica (CoC), Metal sobre Metal (MoM) y Metal sobre Propileno Reticulado (MoP) (FIGURA 4). Los dos últimos subtipos emplean NMs metálicos (principalmente partículas de cromo-cobalto y cobalto), hecho que será estudiado con posterioridad para entender sus posibles implicaciones en la toxicidad a partir de la liberación de dichas NPs y su internalización en el organismo del ser humano.

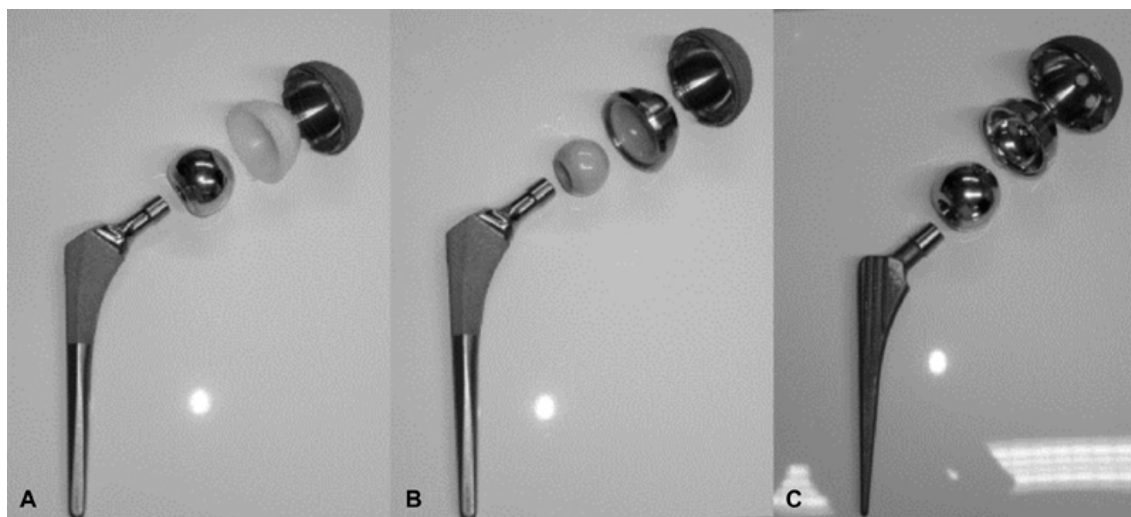


Figura 4. (A) Metal sobre cojinete de polietileno altamente reticulado. (B) Cojinete de cerámica sobre cerámica. (C) Cojinete de metal sobre metal. (9)

Sin embargo, el uso de NMs en la medicina no se limita a la aplicación sobre implantes protésicos, por lo que también es interesante señalar el papel que ejerce un tipo especial de NPs de metal sobre las células tumorales (10). Por medio del mismo mecanismo que se describirá posteriormente (liberando iones de cobalto y generando ROS, daños en el DNA, citoquinas proinflamatorias) y que se relaciona directamente con fenómenos de genotoxicidad y posible carcinogénesis. En este caso, estas NPs parecen proteger de la progresión tumoral. Los estudios *in vivo* e *in vitro* consisten en la síntesis de un potente anticancerígeno basado en NPs de Ácido fosfonometil-iminodiacético conjugado con óxido de cobalto (PMIDA-CoO) y expuesto sobre células leucémicas humanas (Jurkat, células K562 y KG1a). En este caso, la exposición a NPs de PMIDA-CoO resultó en una liberación de iones de Co^{++} más rápidamente en las células tumorales debido a su mayor carga superficial negativa siendo estos iones rápidamente internalizados por estas células (respetando las células sanas). El estrés oxidativo generado, puede activar la vía p38-MAPK lo que influye en la citotoxicidad y muerte de las células tumorales.

3.4. RIESGOS EN LA EXPOSICIÓN A NANOMATERIALES

En lo referente a los riesgos en la exposición a NMs, se abordan dos campos fundamentales de afectación, por un lado, los riesgos asumidos por las personas que entran en contacto con los NMs y por otro, los riesgos que supone su relación con el Medio Ambiente. Primeramente, antes de adentrarnos en problemas particulares, debemos considerar la existencia de tal riesgo en su exposición. Este tema (en cuanto a cómo se produce biológicamente su toxicidad) se expondrá en siguientes apartados, pero en este momento, lo que sí que hay que recalcar es que dicho riesgo es real, ya que se sabe que cada vez existen más NPs en los materiales con los que nos relacionamos y también se conoce la facilidad con la que pueden penetrar en el organismo escapando al control (puesto que es probable que no seamos conscientes de ello debido a su reducido tamaño, sus propiedades y características únicas) y a su vez también se sabe

los efectos que provoca sobre el organismo. El siguiente paso, tras reconocer la existencia del peligro, sería evaluarlo, caracterizarlo y tras todo lo anterior, el último paso se correspondería con el establecimiento de normativas para asegurar la prevención y en un futuro mejorar los NMs de modo que no supongan ningún riesgo o un riesgo mínimo (temas que se detallarán más adelante).

Si ponemos como ejemplo los NMs en la industria agroalimentaria, podemos establecer el orden comentado previamente analizando los riesgos de su exposición por vía gastro-intestinal. Partiendo de la base siempre de que un material o partícula en escala nano va siempre acompañado de un riesgo superior que su homólogo de tamaño mayor, algunos organismos o entidades se han adentrado en estas competencias y han sentado los pasos que deben de seguirse para su análisis. Así pues, desde 2006 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) a la que se añadieron en 2010 estados miembros ha establecido una red de evaluación del riesgo de la nanotecnología en piensos y alimentos (<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/nanotechnology>) (5).

La materia legislativa se expondrá en el apartado de Prevención, pero en esta sección, se puede apuntar que algunos países consideran que la normativa actual es suficiente para regular los NMs, pese a que realmente todavía no existe una legislación completa dedicada a ellos.

Antes de comercializar un producto, se deben realizar los estudios *in vivo* e *in vitro* necesarios para valorar el riesgo en función a su composición química, características fisicoquímicas, su interacción con tejidos y niveles de exposición, analizando los productos atendiendo a cuatro escenarios posibles: su estado originario, comercialización para su uso en la alimentación, su estado en los alimentos y su estado en los tejidos y fluidos biológicos. Las etapas que se siguen en el proceso se resumen en cuatro puntos: Identificación del peligro, evaluación dosis-respuesta o caracterización del peligro, evaluación de la exposición en la industria alimentaria y caracterización del riesgo. En cuanto a la identificación del peligro, se debe proceder en primer lugar a la caracterización de NMs (tamaño, carga, solubilidad, reactividad superficial, modo de ingestión, almacenamiento, etc.), utilizando métodos apropiados para su evaluación acordes al tipo de NM que en piensos y alimentos se reducen a tres estamentos (técnicas de imagen, de separación y técnicas de espectroscopia)- (TABLA 3). El segundo paso en la identificación del peligro es conocer la biocinética de los materiales de escala nano (absorción, distribución, metabolismo y excreción). La absorción en este sector va a ser por vía oral principalmente (aunque la vía principal en general en cualquier sector y sobre todo el profesional, es la inhalación). También es importante señalar la predilección de estos materiales por la interacción con las proteínas más que con otros elementos, facilitando de este modo su adsorción a ellas y su posterior penetración en el organismo por un incremento de la permeabilidad. No se sabe mucho sobre el proceso de distribución, aunque se conoce que los NMs metálicos suelen distribuirse por el hígado y el bazo, pudiendo ser de todos modos cualquier órgano su diana (inclusive cerebro y paso a través de la placenta). Su composición química determinará su tipo de metabolismo, algunos son biodegradables (poliméricos) y otros como los óxidos de metales y metales tienen un metabolismo muy bajo. Respecto a su excreción poco se sabe. Unos son eliminados por bilis o por vía

renal y los más insolubles podrían quedar almacenados durante mucho tiempo en el hígado o bazo y pasar de allí a otros órganos.

El tercer paso en la identificación del peligro es estudiar la toxicidad de los NMs. En la actualidad contamos con pocos estudios *in vivo*, aunque un número importante de estudios *in vitro* que determinan los efectos de estos materiales sobre las células determinan que provocan principalmente daño en el DNA, genotoxicidad, descenso de la viabilidad celular, etc. Pese a que, en nuestros días, existen muchos problemas en los estudios (como el problema de interpretar resultados, el empleo de dosis de NMs no relevantes fisiológicamente, el inconveniente de agregación de NPs, etc.), se han podido demostrar casos específicos de daños directos acometidos por materiales concretos sobre células concretas. Por ejemplo, *Ávalos et al.* (2014, 2015) (5) demostraron que NPs de plata de 4.7 y 42 nm fueron citotóxicas y genotóxicas en células humanas tumorales (hepatoma y leucemia) y normales (fibroblastos de piel y pulmón). También otros autores llegaron a conclusiones al respecto, como *Kang et al.* (2013) (5) que establecieron que NPs de Óxido de Zinc de diferentes tamaños (26, 62 y 90 nm) afectaban a la viabilidad de células Caco-2; *Cha et al.* (2007) (5) quienes observaron efectos genotóxicos de NPs de Zn (300 nm), Fe (100 nm) y Si (10-20, 4050 y 90-110 nm) en células humanas de cerebro, hígado, estómago y pulmón y *Jos et al.* (2009), *Pelka et al.* (2009) y *Wang et al.* (2008) (5) quienes demostraron los efectos tóxicos de nanotubos de carbono y platino y puntos cuánticos de Selenuro de Cadmio en células intestinales Caco-2.

	Categoría	Técnicas
	Imagen	<ul style="list-style-type: none"> ✧ Microscopio electrónico de transmisión (TEM). ✧ Microscopio de fuerza atómica (AFM). ✧ Dispersión de luz dinámica (DLS). ✧ Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).
	Separación	<ul style="list-style-type: none"> ✧ Cromatografía hidrodinámica (HDC). ✧ Fraccionamiento campo-flujo (FFF). ✧ Dispersión de luz de ángulo múltiple (MALS).
	Espectroscopia	<ul style="list-style-type: none"> ✧ Espectrometría de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS). ✧ Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX). ✧ Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). ✧ Espectrometría de absorción atómica (FAAS).

Tabla 3. Técnicas para la detección y caracterización de NMs en alimentos, piensos y otras muestras biológicas (*Bouwmeester et al.*, 2014). (5)

A continuación, tras la identificación del peligro, los organismos proponen su caracterización o evaluación dosis-respuesta, pudiendo ser este punto el más difícil de todo el proceso por la falta de datos sobre toxicidad en NPs y su imposibilidad para extrapolar las conclusiones obtenidas en macromoléculas a sus homólogos nano sobre los humanos. Por tanto, aún no se puede valorar cuantitativamente el peligro hasta no tener más datos certeros sobre valores límite de NMs que permitan determinar los modelos dosis-respuesta.

El proceso continúa con la evaluación de la exposición a NMs en la industria alimentaria, en donde aparecen múltiples herramientas y dos parámetros que estudiar, los aspectos cuantitativos y cualitativos (recogidos en la *TABLA 4*), no siendo sólo suficiente en el caso de los NMs la estimación en unidades de masa (mg/kg de alimento, por ejemplo) para establecer la exposición humana a la dieta, sino que es preciso contemplar otros muchos aspectos como ya se ha explicado.

Una vez establecidos los tres pasos previos, el proceso terminaría con la caracterización cuantitativa y cualitativa del riesgo, es decir, determinar su efecto sobre el ser humano o su tolerabilidad teniendo en cuenta los tres pasos previos. En el momento de realizar esta revisión, resulta arduo elaborar la última etapa por la complicación de valorar las dos fases anteriores.

Parámetros de exposición cualitativos	Parámetros de exposición cuantitativos
<ul style="list-style-type: none"> ✧ Identificación del nanomaterial ✧ Categoría del producto ✧ Tipo de producto ✧ Volumen / diseño del paquete del producto ✧ Matriz para el nanomaterial ✧ Uso del producto/ manipulación del producto durante su uso/ aplicaciones o procesos involucrados ✧ Consideraciones sobre el mal uso previsible ✧ Sitio de superficie corporal expuesta ✧ Identificación de las vías de exposición específicas (vías de exposición primaria y secundaria) ✧ El uso directo / indirecto (destinado a la exposición humana o no) ✧ Generación de nanomaterial durante su uso (exposición especialmente inhalación) ✧ Grupos específicos (niños, adolescentes, hombres adultos, mujeres adultas, etc.) 	<ul style="list-style-type: none"> ✧ Concentración de nanomaterial en el producto ✧ Volumen utilizado ✧ Tasa de retención del producto (por ejemplo, fracción ingerida) ✧ Grado de liberación / migración del nanomaterial desde la matriz ✧ Área superficial del producto en contacto ✧ Duración de la exposición ✧ Frecuencia de la exposición

Tabla 4. Principales parámetros cualitativos y cuantitativos para determinar la exposición de los NMs (Danish Ministry of the Environment, 2015). (5)

Siguiendo con los riesgos provocados por la exposición a través de la vía digestiva, se procederá ahora a especificar dichos riesgos (6).

A nivel general, los NMs pueden provocar sobre el sistema digestivo (sobre todo tras una extensa exposición sistémica y una absorción intestinal) reacciones inflamatorias y degradación de la mucosa intestinal, (originando enfermedades tales como la Enfermedad de Crohn o la Colitis Ulcerosa), sensibilización y alergias alimentarias y enfermedades autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico, Esclerodermia y Artritis Reumatoide (si bien la información sobre NMs y su acción sobre el sistema gastro-intestinal es escasa). Existen estudios contradictorios sobre su implicación en el desarrollo y crecimiento, su papel sobre el sistema endocrino actuando como disruptores (se detallará más adelante) y sobre otros sistemas, como el reproductor. En este último punto, estudios sugieren la existencia de trastornos en los niveles de hormonas

sexuales masculinas y femeninas tras la exposición a NPs, cambios en la viabilidad celular gonadal, espermatogénesis y morfología testicular en los hombres, así como alteración en la ovogénesis y maduración folicular en mujeres. Sin embargo, ningún estudio ha podido confirmar estas especulaciones, puesto que no se ha visto realmente alterada la función reproductora masculina y femenina tras su exposición a NPs.

La toxicidad resultante de la absorción por vía gastro-intestinal y sus posibles repercusiones son aspectos que conviene analizar con detenimiento. Se debe considerar la fabricación de los NMs ya que pueden surgir impurezas en el proceso de fabricación que afecten a su toxicidad final o tener recubrimientos tensoactivos superficiales que cambien su condición de producto no peligroso a dañino o viceversa. Al mismo tiempo, también es posible que la interacción de los NMs con enzimas digestivos, electrolitos, microbiota intestinal, pH y otros elementos varíen sus propiedades fisicoquímicas originales, del mismo modo que el organismo también puede sintetizar de novo NMs en la luz intestinal (por ejemplo, las NPs de fosfato de calcio de entre 20 y 200 nm que se forman en la parte media distal del intestino delgado por la precipitación de iones de calcio y fosfato). Todas estas consideraciones son imprescindibles para valorar los efectos reales de la exposición (asumiendo las múltiples variables) y establecer conclusiones fidedignas.

Para entender con mayor claridad estas ideas, se aportan ejemplos de NPs de metales que, tras ser ingeridas, provocan daños en distintos niveles. Estudios *in vivo* sobre ratones, han demostrado que la ingestión de NPs de ZnO tiene un mayor acúmulo en hígado, bazo y riñones en comparación con su homólogo en escala micro. También existen estudios al respecto que revelan que la citotoxicidad (tras la ingestión) de estas NPs de ZnO (8-10 nm) en las células del carcinoma de colon humano RKO y Caco-2 no depende de la concentración de iones Zn^{2+} liberados en el medio, sino del contacto directo entre NPs y las células, ya que éstas modifican el metabolismo de los metales, las chaperoninas y los genes de plegamiento de las proteínas independientemente de los iones. Otros estudios han evidenciado que NPs de SiO_2 (25-100 nm) *in vitro* tienen una genotoxicidad y citotoxicidad limitada en células HT-29 tras 24 horas de exposición. En cuanto a la administración por vía oral de NMs que contengan NPs de Ag, se sabe que se han realizado estudios *in vitro* los cuales han evidenciado su potencial tóxico sobre células de mamíferos y humanos derivadas del tejido vascular, cerebro, sistema gastro-intestinal, hígado, pulmón y tejido reproductivo, al provocar estrés oxidativo y efectos directos sobre las mitocondrias, señalándose además en estos estudios que el daño no sólo depende de su liberación de iones Ag^+ en el medio, sino de la propia interacción con NPs. Como último ejemplo, se pueden citar las alteraciones relativas a la ingestión de NP de TiO_2 . Estudios sobre esto han remarcado el potencial de estas partículas para penetrar en las barreras testicular, placentaria y hematoencefálica, si bien es verdad que parece que su tasa de translocación es baja. Sin embargo, no está claro que estas partículas nano puedan provocar toxicidad reproductiva o para el desarrollo en humanos, pese a que sí se han observado estos daños en estudios *in vivo* e *in vitro* sobre animales de experimentación.

Hilando con la idea de la posible conexión entre NMs en el Medio Ambiente y su efecto sobre el sistema metabólico, endocrino y reproductivo de los seres humanos, existe una evidencia acumulada que apunta hacia este papel como posibles disruptores endocrinos (7). Muchos estudios realizados hasta la fecha siguen investigando todos estos mecanismos y sugieren la asociación entre NMs y patrones de crecimiento anormal, retraso en el desarrollo neurológico de los niños, alteraciones reproductivas en ambos sexos y una superior incidencia del cáncer mama. Del mismo modo, estudios *in vivo* e *in vitro*, han revisado su papel como posibles agentes causantes de la Diabetes Mellitus (DM) tipo 2, el Síndrome Metabólico y la obesidad, al alterar presuntamente la función de las células β pancreáticas provocando una resistencia a la insulina y un trastorno en la homeóstasis de la glucosa.

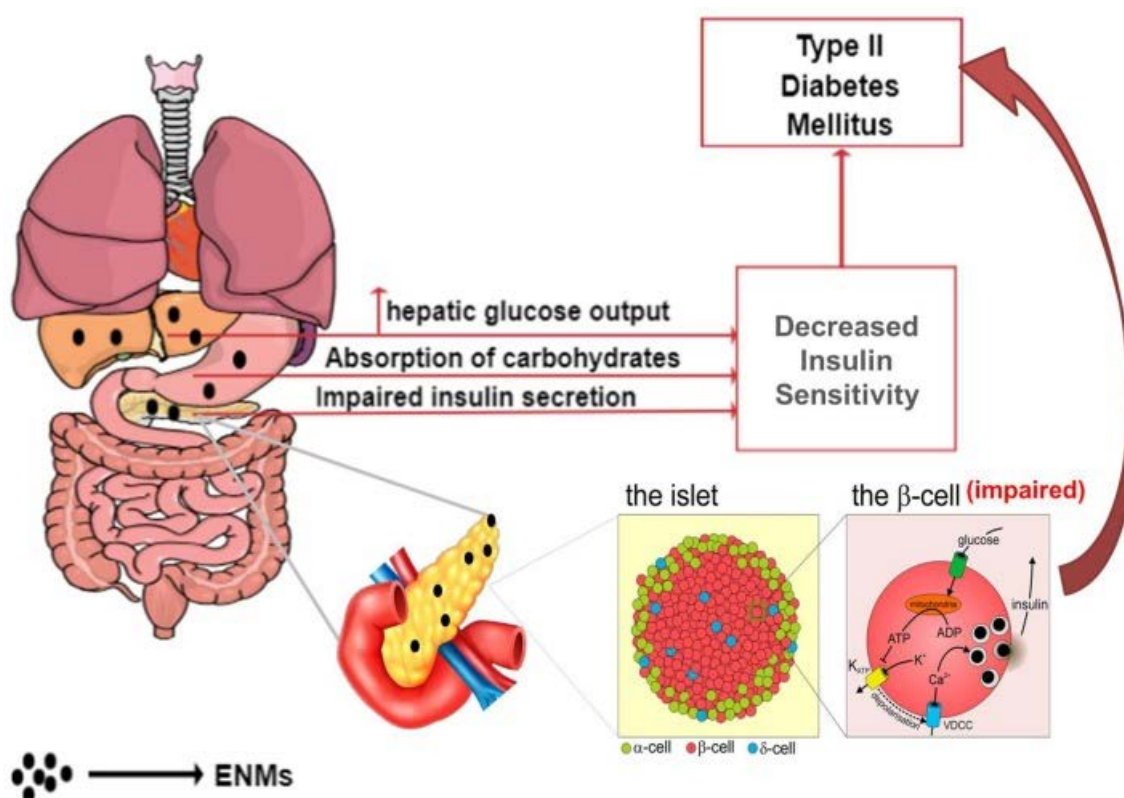


Figura 5. Efectos de ENM en el sistema gastrointestinal, lo que lleva al desarrollo de DM2.(7)

Dos son los principales mecanismos a través de los cuales los NMs pueden desencadenar la DM tipo 2 afectando a la síntesis de insulina (FIGURA 5): primero, una menor sensibilidad a la insulina y segundo, un deterioro de las células β pancreáticas, teniendo en cuenta que su papel como disruptores implica una interacción con los receptores celulares, por medio de un bloqueo hormonal o por medio de la imitación de hormonas naturales (FIGURA 6). Se han estudiado varios aspectos capaces de determinar el primer mecanismo relacionado con una menor sensibilidad a la insulina, tales como el deterioro en la acción de la insulina celular, la interacción con receptores estrogénicos, variaciones en las vías homeostáticas y la inflamación como causa de la resistencia a la insulina. Estudios realizados con ciertas dosis de NPs de TiO_2

mostraban que estas partículas podían provocar indirectamente una respuesta inflamatoria en macrófagos (liberando TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 α e IL-1 β) y provocando una resistencia a la insulina en las células Fao y directamente sobre las células hepáticas activando quinasas de estrés y dando lugar a una señalización anormal de la insulina y consecuentemente un deterioro en su acción. Con el fin de aportar mayor evidencia en este punto, también se realizaron paralelamente otros estudios con otros NMs como NPs de Cromo sobre ratas en condiciones de estrés y calor, hallando como resultados incrementos en las concentraciones del factor de crecimiento IGF-1 y la IgG en suero y detrimentos en las concentraciones de insulina y apuntando la posibilidad de que el cromo incremente la fluidez de la membrana, internalizando la hormona y reduciendo así sus niveles periféricos.

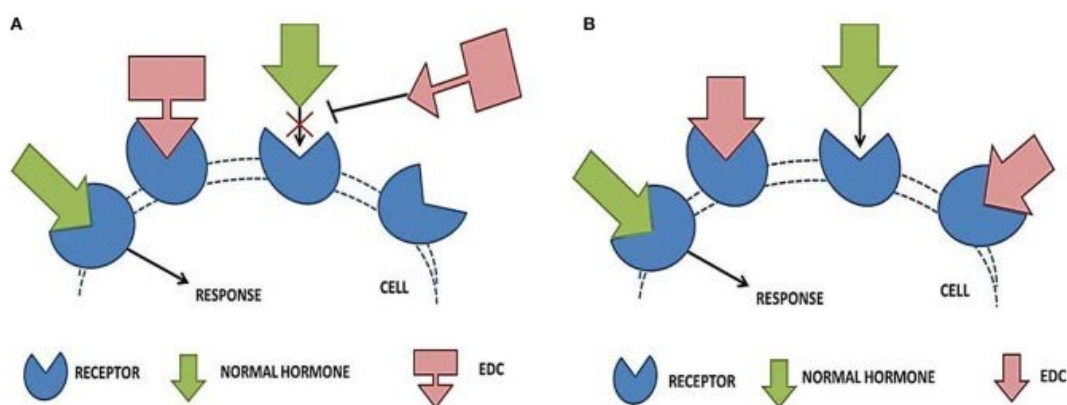


Figura 6. Efecto de productos químicos disruptores endocrinos sobre la interacción hormona-receptor. (A) Muestra la acción de bloqueo de los EDC, donde se une al receptor dentro de la célula y bloquea la unión de la hormona endógena. La señalización normal se bloquea y el sistema de órganos asociado (hígado y páncreas) no responde adecuadamente. En (B), se representa la acción de imitación de los EDC. Los EDC imitan total o parcialmente las hormonas naturales, lo que interfiere con las respuestas fisiológicas obvias. (7)

En otro término, encontramos la interacción de materiales nano con los receptores estrogénicos ER- α y ER- β expresados en tejido adiposo, páncreas, hígado y músculo esquelético. Existen informes que revelarían que los NMs actuarían antagonizando estos receptores (cuya misión es modular la secreción de insulina pancreática y la sensibilidad hacia la misma) y, disminuyendo la sensibilidad a la insulina consecuentemente.

Asimismo, estudios *in vitro* han relacionado la exposición a NMs metálicos y la aparición de hiperglucemia al variar las vías homeostáticas de la glucosa. Todo este proceso sería resultado de la interacción con los factores señalizadores de la insulina (PI3K, proteína quinasa B, diana de rapamicina-mTOR- y AMPK) y una menor transducción de su señal y un descenso final en la acción de la insulina. Pero más interesante resulta su acción sobre el sistema inmune y la inflamación como causa de la resistencia insulínica. Esta teoría apunta a que la toxicidad de los NMs mediada por la inflamación, sería consecuencia de que

éstos son reconocidos por el Sistema Inmune como antígenos desencadenando una respuesta inflamatoria aguda al liberarse más citoquinas por el tejido adiposo y provocar una señalización molecular que concluya en el desarrollo de DM tipo 2 (FIGURA 7).

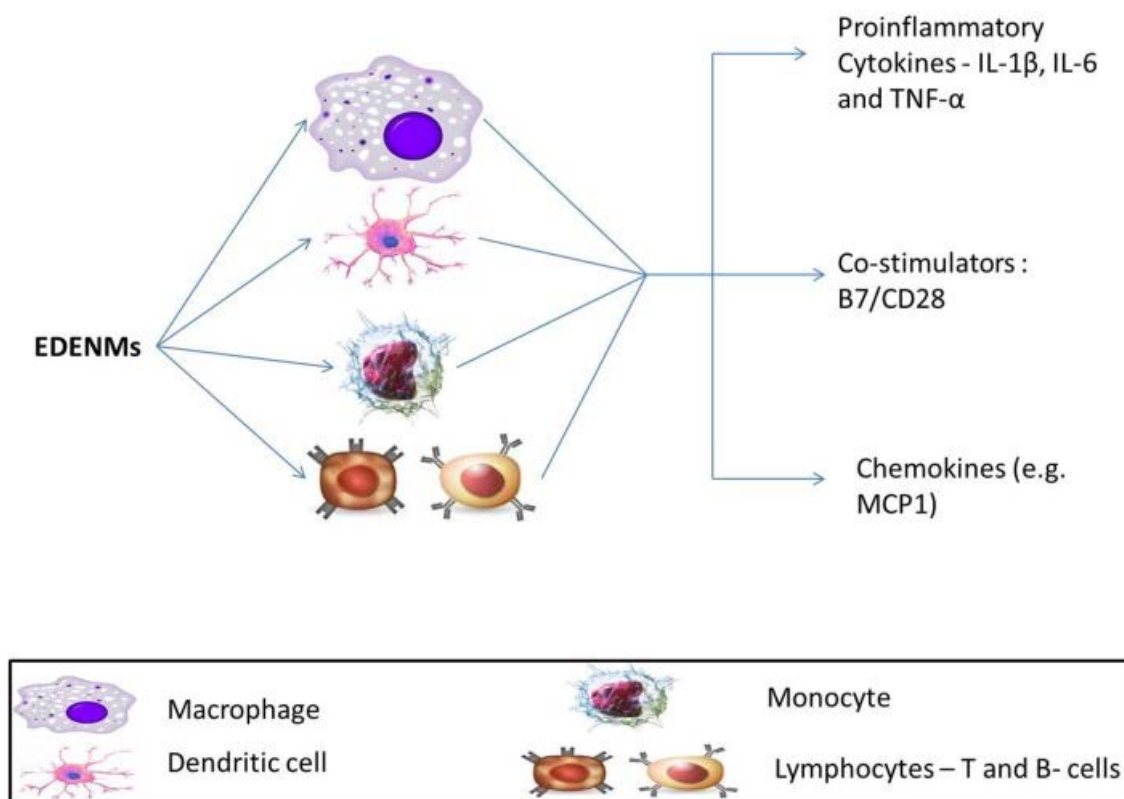


Figura 7. Efecto de EDENM en diversas células inmunes que da como resultado una mejora de la expresión de diversas citocinas proinflamatorias, miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas: B7 / CD28 y quimiocinas. (7)

El segundo mecanismo que se atribuye a la aparición de la DM tipo 2, es el deterioro de las células β pancreáticas. Los NMs provocan un incremento del estrés oxidativo por medio de ROS y estrés oxidativo en el retículo endoplásmico, conduciendo finalmente a la apoptosis celular de los islotes pancreáticos y una alteración del metabolismo de lípidos y glucosa.

Hasta este punto, se ha venido estudiando la vía oral como puerta de entrada de los NMs, pero ya se citaron previamente las otras rutas, la respiratoria y la dérmica (11). La inhalación de las partículas sigue siendo la vía principal, mientras que la piel, (aunque es la peor de todas las vías por su función de barrera protectora), permite la absorción de Partículas Ultrafinas a través de folículos pilosos y flexuras. De hecho, se han descrito casos de quemaduras, síntomas hepatotóxicos, aspecto grisáceo en el rostro y niveles elevados de plata en plasma y orina tras aplicar un tratamiento con vendajes que contenían partículas de plata, así como otros ejemplos de intoxicación por NPs al observarse la aparición de un eritema multiforme tras la exposición laboral a dendrímeros. La citotoxicidad asociada a los NMs todavía precisa de mucha investigación, pero contamos con literatura científica que corrobora ciertos efectos nocivos sobre el ser humano (TABLAS 5 y 6) y exponen las lesiones más

importantes asociadas a NMs. Tras los atentados del 11 de Septiembre de 2001 sobre las Torres Gemelas en Nueva York, un estudio realizado por *Maixin Wu y Ronald E. Gordon* (11) determinó la existencia de nanotubos de carbono en una biopsia pulmonar realizada a las personas encargadas de las labores de rescate y que presentaron síntomas severos respiratorios (sarcoidosis, neumonitis eosinofílica, neumonitis obliterante, asma, laringitis, sibilancias, etc.) tras exponerse a una nube de humo con polvo contaminante. Otros estudios realizados en Suecia determinaron un descenso de la función ventilatoria en los trabajadores del asfalto en relación con los trabajadores de la construcción con un incremento de mediadores de la inflamación y mayores niveles de exposición a este tipo de partículas ultrafinas. Entre 2009 y 2013, se realizaron estudios sobre la exposición adquirida en entornos laborales. *Song Y. et al* (11) estudiaron en China en el año 2009 la toxicidad por la preparación en fábricas de pinturas de una pasta mezcla de marfil con ésteres poliacrílicos, nanosilicatos y NPs de sílice. Las trabajadoras implicadas en dicha actividad inhalaban las partículas y éstas se albergaron en los alveolos distribuyéndose posteriormente por otros órganos. Los síntomas que presentaron fueron disnea, erupción cutánea, fibrosis pulmonar, derrame pleural y pericárdico, trombocitopenia, daños renales y hepáticos. El proceso de niquelado y su vínculo con la inhalación de NPs de níquel fue estudiado por *James I. Phillips et al* (11) quienes reportaron un caso de muerte a consecuencia de un Síndrome de Distrés Respiratorio del Adulto. Las NPs de dióxido de titanio inhaladas en procesos de aerosolización en fábricas de pintura, se han relacionado con ictericia, fiebre y bronquiolitis obliterante. Como efectos nocivos sobre el ser humano, a su vez, encontramos otros daños relacionados con otros materiales, tales como hepatotoxicidad e inflamación sobre el bazo tras exposición a nanotubos de carbono y trombosis, isquemia, arritmia y cáncer de pulmón en asociación con SiO₂.

NPs	Aplicaciones	Toxicidad
Dióxido de silicio (SiO₂)	Electrónica, telecomunicaciones e industria aeroespacial	<ul style="list-style-type: none"> – Alteraciones cardiovasculares y pulmonares – Cáncer de pulmón
Nanotubos de carbono	Electrónica, instrumentación científica, fotónica, biotecnológica, energética y mecánica	<ul style="list-style-type: none"> – Acumulación en hígado, pulmones y bazo – Inflamación pulmonar – Fibrosis pulmonar y granulomas
Rutilo (TiO₂)	Filtros solares, industria cosmética, tratamiento de aguas y electrónica	<ul style="list-style-type: none"> – Estrés oxidativo – Carcinógeno
Negro de carbón	Refuerzo de neumáticos, pinturas y plásticos	<ul style="list-style-type: none"> – Fibrosis pulmonar
NPs Metales	Industria cosmética, electrónica, médica y textil	<ul style="list-style-type: none"> – Estrés oxidativo – Hemólisis y trombosis – Acumulación en bazo, hígado y riñón
Otras NPs	Catalizadores, revestimientos, biomedicina, placas solares	<ul style="list-style-type: none"> – Estrés oxidativo

Tabla 5. Principales NPs, aplicaciones y efectos nocivos sobre la salud. (11)

Efectos agudos	Efectos crónicos
Reacciones inflamatorias del pulmón	Incremento de síntomas respiratorios
Síntomas respiratorios	Reducción de la función pulmonar en adultos
Efectos adversos en el sistema cardiovascular	Aumento en enfermedad pulmonar obstructiva crónica
Aumento del uso de medicamentos	Reducción de la función pulmonar en adultos
Aumento de ingresos hospitalarios	Reducción de la esperanza de vida
Alimento de la mortalidad	–

Tabla 6. Principales efectos sobre la salud más frecuentemente asociados a la exposición de partículas ultrafinas (PUFs) y NPs. (11)

En otro orden de cosas, es conveniente abordar la relación entre NMs y el Medio Ambiente, ya que no sólo estos materiales afectan a la salud de los seres humanos sino también a otras especies. Las NPs se pueden liberar a la naturaleza directa o indirectamente por medio de vertederos o plantas de tratamiento de aguas y se pueden dispersar en distintas etapas en la vida de producto que las contiene, (durante su producción, durante su uso o durante su eliminación como material de desecho) (13). En otro sentido, para hablar de su repercusión medioambiental, hay que considerar varios aspectos, primero el medio en el que se libera (agua, tierra o aire), segundo su movilidad y estabilidad en los distintos entornos y tercero el efecto tóxico propio de las NPs sobre cada una de las especies (plantas y animales). Uno de los problemas que nos encontramos para evaluar este riesgo, es el modelo que se emplee para su medición, puesto que puede resultar una estimación imperfecta. Si utilizamos el término de volúmenes de producción (teniendo en cuenta que puede ser significativamente distinto según cómo se recopila la información), en relación con el ciclo de vida de los productos, la mayor parte de las NPs liberadas suceden bien durante su fase de uso del producto o bien durante la fase de desecho, siendo mínima su liberación en el proceso de producción. También, comparando los volúmenes de producción a nivel mundial entre las diversas partículas, se puede afirmar que las NPs de TiO_2 y SiO_2 son las que tienen cifras más relevantes. En cuanto al medio en el que son emitidas, los datos indican que los destinos predilectos son, en este orden, los rellenos sanitarios, seguidos por el suelo, el agua y en último puesto, el aire. Si bien es verdad que, la vía de liberación (como ya se comentó con anterioridad) también va a depender de la NP del material, por ejemplo, el TiO_2 se libera en primer término por medio de aguas residuales, terminando posteriormente en los suelos o en menor medida en vertederos. Lo mismo sucede en las partículas de ZnO , las cuales se eliminan por aguas residuales y acaban en sedimentos, suelos o vertederos. Una vez liberada la NP al medio Ambiente, ésta va a sufrir una serie de procesos de degradación que determinarán en gran medida su toxicidad. Estos procesos se resumen en transformación química, agregación y desagregación (FIGURA 8).

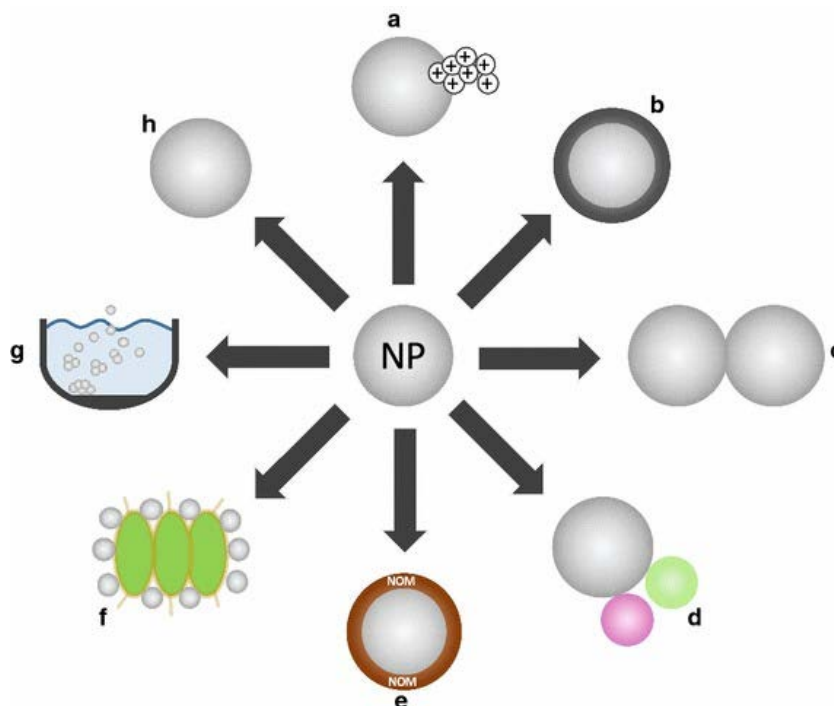


Figura 8. Interacciones y destino de NP en el ambiente considerando (a) disolución, (b) sulfuración, (c) homo-agregación, (d) hetero-agregación, (e) recubrimiento con NOM, (f) adsorción de NP en superficies biológicas, (g) sedimentación / deposición, y (h) persistencia. (13)

No se puede hablar de un único mecanismo genérico de toxicidad, pero se puede afirmar que, al igual que sucede en los seres humanos, estas partículas son capaces de provocar un estrés oxidativo sobre las estructuras biológicas a través de generación de ROS, aunque existen otros procesos implicados en la toxicidad como trastornos reproductivos por la modificación de hormonas o enzimas de eclosión (se comentarán efectos específicos sobre algunas especies más adelante). Como siempre, es prudente remarcar el hecho de que el daño ejercido por las NPs no sigue estrictamente un patrón causa-efecto, sino que deriva de procesos multifactoriales y, por tanto, es posible que influyan varios factores como las condiciones del terreno, (humedad, contenido de materia orgánica, la textura, la composición iónica y pH), el tiempo o envejecimiento de la NP en la materia orgánica, la interacción de NPs metálicas con otros estresores químicos antropogénicos (pesticidas o herbicidas) y la liberación o no de iones metálicos tóxicos.

Actualmente se conocen cambios en organismos terrestres y acuáticos asociados con la liberación de iones como por ejemplo los efectos de iones de Ag en caracoles y perifiton (conjunto de organismos de hongos, bacterias, algas y protozoos embebidos en una matriz polisacárida) a nivel de cambios transcripcionales y de expresión de proteínas. Cambios producidos por iones de Cu sobre mejillones y branquias de pez cebra o variaciones en los ácidos de las membranas de protozoos o un menor crecimiento en la raíz del trigo cultivado en la arena. Sin embargo, muchos estudios han demostrado que no es posible llegar a una determinación genérica que afirme que el daño ejercido por los iones

liberados sea superior al efecto provocado por la propia NP, sino que puede ser que dichos cambios percibidos se relacionen con las condiciones del estudio (como sistema biológico, recubrimiento de NP y condiciones ambientales). Para los productos que no liberan iones tóxicos, se postula que el factor más relevante en el efecto perjudicial es el recubrimiento biológico de la superficie (unión o adsorción de la partícula a la superficie del organismo) y suele relacionarse más con tamaños menores de las partículas inicialmente y con el área de superficie (FIGURA 9).

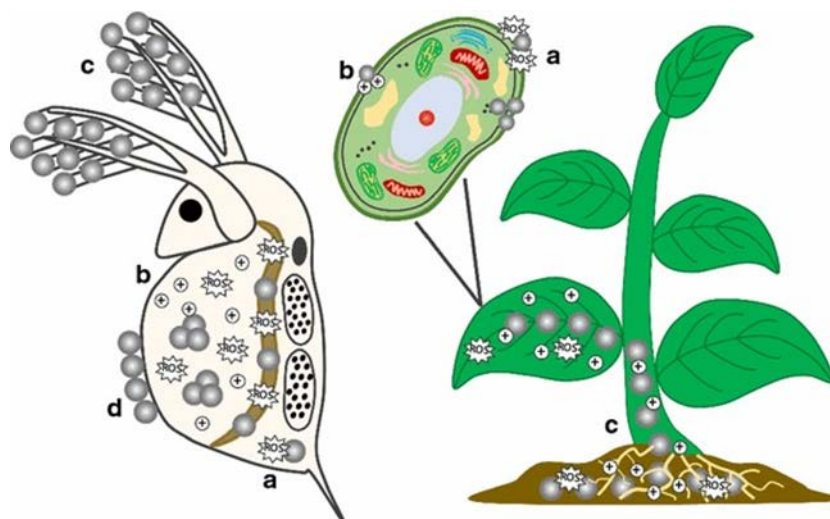


Figura 9. Potencial de ecotoxicidad de NPs en regímenes acuáticos y terrestres, ilustrando mecanismos de acción local como una formación de ROS, (b) liberación de iones, (c) internalización y (d) recubrimiento biológico de la superficie. (13)

El daño causado por NPs en el ambiente puede afectar no sólo a una especie sino también a la interacción entre especies en varios niveles tróficos. Como muestra de esta afirmación, *Antisari et al* (13) informaron de repercusiones en las lombrices de tierra, por cambios en la biomasa del suelo, es decir un efecto indirecto de afectación a los animales invertebrados por medio de cambios en microorganismos. Otros ejemplos serían cambios estructurales en sistemas acuáticos en los que se ven afectados los procesos de la fotosíntesis y descomposición de las hojas relacionados con determinadas partículas nano, así como el crecimiento de varias especies de plantas e incrementos o descensos en el recuento bacteriano tras la exposición a NP de Ag.

En general, los organismos eucariotas (uni o muticelulares) pueden permitir fácilmente la entrada de NPs por fagocitosis y endocitosis, mientras que resulta muy difícil adentrarse en organismos procariotas (bacterias) por sus barreras protectoras (12). Las NPs han demostrado ser perjudiciales para animales acuáticos como peces o dafnias y para organismos unicelulares acuáticos. Así, por ejemplo, los nanotubos de carbono pueden ser tóxicos para el sistema respiratorio de la trucha arcoíris o provocar la mortalidad en cangrejos de agua dulce. Las NPs de látex pueden ser absorbidas por una especie de pez japonés y distribuirse por sus branquias, sangre, intestino, cerebro, etc. causando un

impacto sobre el pez. Por otra parte, otras NPs, tales como las formadas por dióxido de titanio, azufre, óxido de Zinc y plata han demostrado ejercer toxicidad sobre las bacterias y, en concreto, NPs de Ag son utilizadas con fines bactericidas ampliamente probados.

La interacción de NPs con las plantas en particular puede realizarse por sus raíces. Pueden penetrar a través de la pared celular y ser absorbidas por las células (favorecidas por su carga negativa que facilita la absorción) o por sus membranas. Como muestra, podemos hablar de la exposición de NPs de óxido de aluminio sobre el crecimiento de raíces de las plantas o de NPs de dióxido de titanio mejorando el crecimiento de espinacas y demostrando tener efectos sobre el incremento de absorción de nutrientes, transformación de nitrógeno inorgánico en orgánico y mejorar la actividad enzimática.

A modo de conclusión, la idea más importante es que no sólo puede existir un efecto nocivo de la exposición a NMs en el ambiente, ya que también pueden ser útiles reduciendo la toxicidad de otros contaminantes que, al ser absorbidos por las NPs, evitan su efecto dañino sobre los organismos.

3.5. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN Y REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL DNA

En este apartado se tratarán dos aspectos básicos relacionados con la toxicidad asociada a las NPs, en primer lugar, la génesis del proceso, es decir, los mecanismos por los cuales estas partículas pueden dañar las estructuras celulares y el DNA y cuáles son los indicadores de este daño y, en último término, se abordarán los posibles aliados que se están estudiando para reparar todos estos procesos. En cuanto al primero de los aspectos, actualmente todos los caminos parecen indicar que el papel predilecto lo tienen las ROS, las cuales, por un proceso todavía no muy bien establecido, serían capaces de provocar un estrés oxidativo, muerte celular, inhibición de la división celular e inflamación (27). Según este proceso, las NPs siguiendo diversas vías penetran en el organismo donde son reconocidas por las células por medio de una corona proteica e interactúan con ellas, pudiendo internalizarse en la célula mediante endocitosis, vesículas endocíticas y liberación de iones de partículas desde las vesículas a la célula, una vez dentro serían capaces de generar ROS. Si bien los mecanismos de producción de los radicales varían según el tipo de NP y sus propiedades específicas (tamaño, carga, etc.), se sabe que la mayoría de las partículas metálicas lo hace por reacciones Fenton. Por conocimiento general, en el organismo de los seres humanos para que todo funcione con normalidad, debe existir una homeostasis entre los radicales libres o especies reactivas de oxígeno generadas, por ejemplo, superóxido, hidroxilo, hidroperoxilo, carbonato y las enzimas desintoxicantes como SOD (SOD1, SOD2 y SOD3), GPX y CAT o sustancias antioxidantes como los flavonoides, ácidos ascórbicos, vitamina E y GSH (*FIGURAS 10 A y B*).

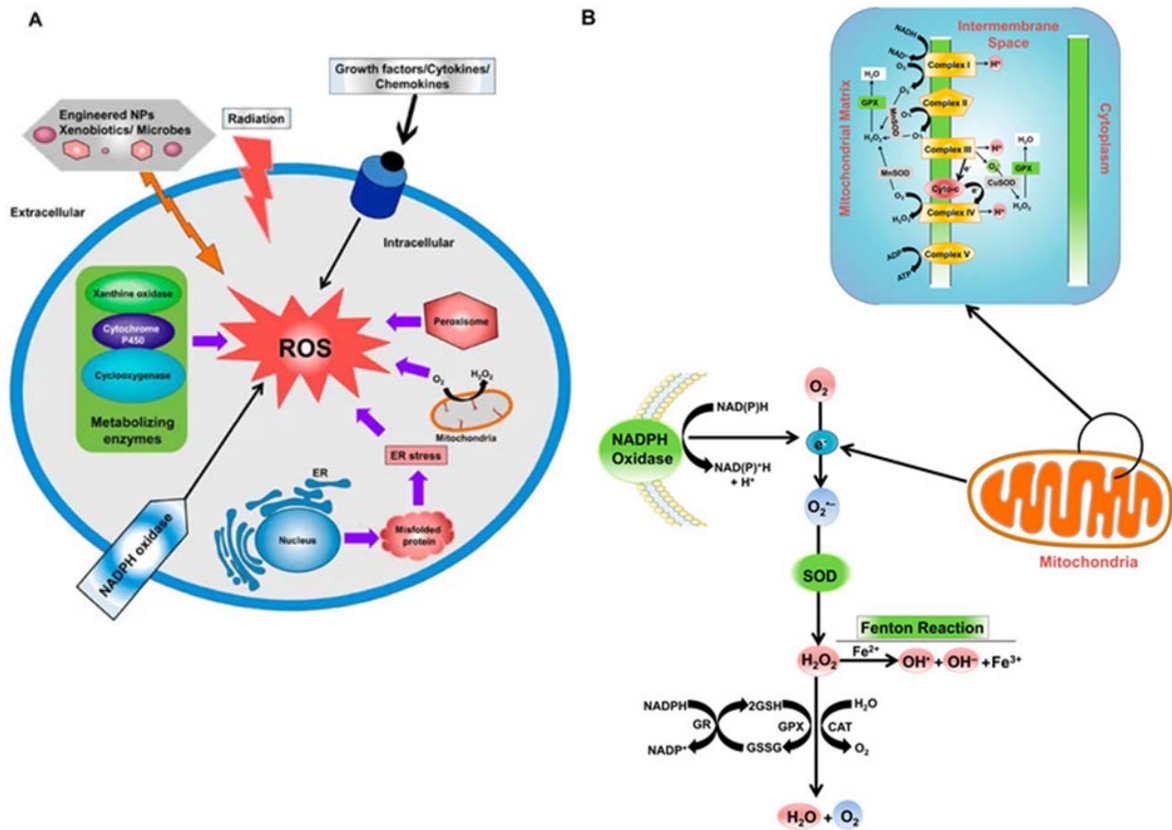


Figura 10. A. Diagrama descriptivo de las fuentes intra y extracelulares de generación de ROS. Las fuentes extracelulares están representadas por contaminantes ambientales, exposición a radiación, infección microbiana y a NPs de ingeniería. ROS intracelulares pueden generarse a partir de mitocondria, estrés del retículo endoplásmico, la familia NOX y enzimas metabolizadoras celulares. **B.** Diagrama esquemático que resume la formación de ROS a partir de NADPH oxidasa y mitocondrias y los mecanismos involucrados en la eliminación de ROS. (27)

Por tanto, un desequilibrio que genere un incremento de ROS más allá de su control terminaría en interferencias sobre la señalización celular encargada de regular procesos como proliferación celular, diferenciación y muerte, originando daños en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, (todo ello por medio-entre otros- de la expresión de citocinas proinflamatorias y activación de neutrófilos y macrófago).

También hay que señalar, que la generación de radicales libres (tras la exposición o no a NPs) se lleva a cabo en varios sitios: fundamentalmente a nivel mitocondrial (se produce un incremento de Ca^{2+} citosólico que activa la cadena de transporte de electrones y generación de ROS, interviniendo en su formación los Complejos I y III), aunque también fuera de la mitocondria se sintetizan en el Retículo Endoplasmático, peroxisomas, complejos NOX de la membrana (siete isoformas para generar superóxido) y enzimas celulares como xantina oxidoreductasa, NO sintasa, citocromo P 450 monooxigenasa, lipoxigenasa y ciclooxigenasa (FIGURA 11).

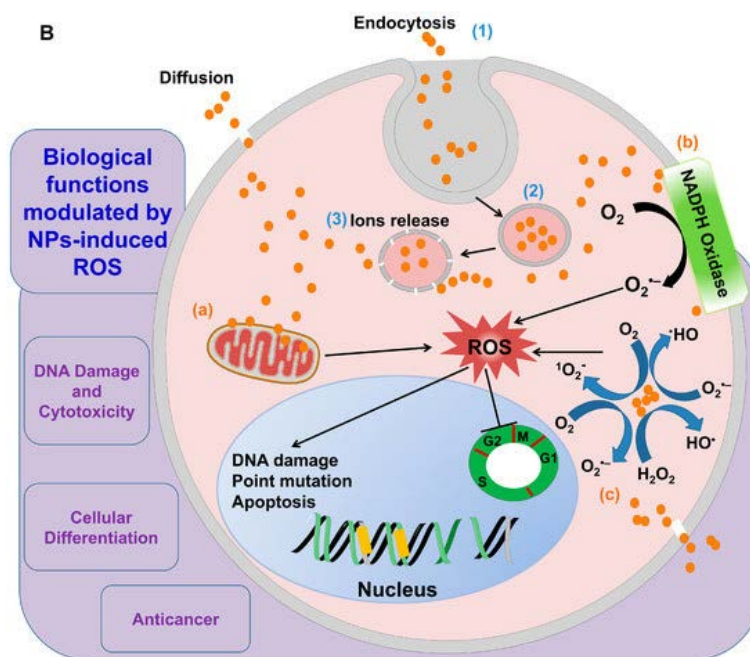


Figura 11. Diagrama esquemático que describe los mecanismos implicados en la producción de ROS inducida por NP. Los NP pueden internalizarse en la célula mediante (1) endocitosis; (2) formación de las vesículas endocitóticas; y (3) liberación de iones de partículas desde las vesículas a la célula. Los principales factores responsables de la generación de ROS por NP incluyen: (a) interacción con la mitocondria; (b) interacción con NADPH oxidasa; y (c) factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas (tamaño, forma, propiedades fotoquímicas y química de la superficie). Estos factores conducen a la generación de ROS y sus consecuencias, incluyendo daño en el ADN, detención del ciclo celular, alteraciones en la apoptosis y daño a la membrana celular. (27)

Para entender mejor la situación, es necesario explicar qué diferencia a las NPs de sus homólogos a gran escala a la hora de producir más ROS y generar más daño. Primero, su tamaño menor permite una mayor internalización celular (como se mencionó con anterioridad por endocitosis mediada o no por clatrina o caveolina). Segundo, las NPs tienen una mayor área superficial (puesto que la relación superficie-volumen es inversamente proporcional al tamaño de la partícula, es decir, cuanto más pequeña sea, mayor es su superficie y su masa). El hecho de tener una mayor área superficial provoca una mayor fricción de átomos y promueve una mayor reactividad química (según los materiales por reacciones de Haber-Weiss y Fenton), favoreciendo la catálisis y superiores niveles de ROS. Tercero, aquellas NPs que tienen un confinamiento cuántico (QD) pueden variar los procesos catalíticos, ya que pueden cambiar su

capacidad para donar o coger cargas eléctricas, y, por tanto, modificar la afinidad de las NPs, lógicamente influyendo sobre el número de reacciones químicas posteriores. Cuarto, la capacidad para inducir los cambios celulares y generar más ROS es directamente proporcional a la concentración de NPs a la que se exponen las células, esto significa que a más NPs o más tiempo de exposición, se crearán más ROS, puesto que se superan todos los mecanismos naturales capaces de inhibirlos. En quinto lugar, podemos hablar de la interacción de las NPs con los distintos sistemas de generación de ROS. Por ejemplo, ciertas NPs pueden incrementar la oxidación de NADPH en NADP⁺, la oxidación del Citocromo C y la formación de disulfuro de glutatión-todos ellos implicados en toxicidad y estrés oxidativo, la activación de NOX y posterior activación de células inmunes y el bloqueo de la cadena de transporte mitocondrial (incrementando el superóxido en la célula).

Existen varias muestras en las cuales se puede observar el modo en el que las NPs interfieren en procesos celulares por el mecanismo de síntesis de ROS. Gracias a este mecanismo, por ejemplo, ciertas partículas como las Ag NPs, al generar ROS se ha demostrado que ejercen una función antimicrobiana sobre determinados microorganismos (*Pseudomona A.*, *E.Coli*) e influyen en los procesos de diferenciación celular, contribuyendo al crecimiento de las neuritas en células SH-SY5Y del neuroblastoma humano. En esta misma línea, otros estudios han demostrado que esta capacidad para generar ROS por parte de NPs puede ser explotada en la síntesis de nuevos tratamientos anticancerígenos o terapias potenciadoras de células madre. Respecto a los primeros, la muerte celular sería secundaria a un incremento de ROS adicional capaz de iniciar necrosis, autofagia o apoptosis celular, terminando con células tumorales potencialmente peligrosas. En el cáncer de mama humano, la exposición a varios metales de tipo nano se ha correlacionado con resultados positivos: en las células MCF-7 el tratamiento con TiO₂ NP junto con Zn provocó la elevación de ROS secundaria al descenso de Glutathion (GSH), de Superóxido Dismutasa e incremento del gen oxigenasa-1, disminuyendo de este modo la viabilidad de las células tumorales; en otros estudios sobre células MDA-MB-231 del cáncer de mama humano, se han probado terapias con NPs de Plata, las cuales han conseguido activar la vía de las caspasas-3 favoreciendo así la apoptosis de las células malignas.

En cuanto a las células madre, contamos con varios estudios realizados sobre células madre mesenquimales humanas y de rata y células madre neurales y su efecto tras la exposición a NPs metálicas. Una de las partículas más prometedoras en la terapia de células madre es la NP de plata, la cual promueve la diferenciación adipogénica en células mesenquimales humanas por medio de las especies reactivas de oxígeno. Las NPs de cerio, tienen la función opuesta, participan en la inhibición de ROS, potenciando el tratamiento de la obesidad en ratones al inhibir el cambio de células mesenquimales a adipocitos y en estudios sobre las células mesenquimales humanas, se ha corroborado su función antioxidante eliminando estas especies reactivas. Mientras que, los estudios realizados sobre células neurales aportaron datos de hiperpolarización mitocondrial, descensos de GSH y ruptura de membranas tras tratamiento con SPION.

La implicación de los ROS generados por las NPs en la toxicidad celular y sobre el DNA, viene remarcado en múltiples estudios. Aunque el principal marcador estudiado *in vivo* e *in vitro* en genotoxicidad es el 8-hidroxil-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) (el cual conduce al daño sobre los ácidos nucleicos y procede de la interacción de HO• con el DNA), también se ha demostrado relación entre peroxidación lipídica secundaria a ROS y mutaciones sobre el DNA. Algunos de estos estudios (existen muchos más ejemplos sobre otros tejidos celulares humanos y animales) se han realizado en queratinocitos epidérmicos humanos tratados o expuestos a diversas NPs metálicas y observándose una formación de micronúcleos, peroxidación lipídica y daño en el DNA tras la generación de ROS.

En otro orden de ideas, se puede hacer referencia a ciertos mecanismos inductores de reparación celular tras el estrés provocado por NPs. Uno de los tratamientos que se ha intentado probar para demostrar su eficacia como antioxidante frente al estrés oxidativo dependiente de las NPs y revertir el daño es la NAC (28). Se trata de un compuesto de alcohol de azufre que tiene la peculiaridad de unirse al grupo electrófilo de varios ROS (superóxido, peróxido de hidrógeno y peroxinitrito), pasar por su membrana y acetilarla, generando allí ácido amónico, que es un precursor del GSH capaz de ejercer su función protectora como potente antioxidante. En concreto, existe un estudio que trataba de ensayar el NAC como posible tratamiento profiláctico o postquirúrgico capaz de revertir los posibles efectos nocivos de las NPs de cromo-cobalto liberadas tras la colocación de una prótesis de cadera metálica. Para ello, en este estudio, se analizaron los efectos de las NPs de Cobalto sobre células TCMK-1 tubulares renales de ratón y el efecto en otras expuestas y tratadas con NAC. El resultado en las células expuestas al metal, pero sin tratar, fue el del incremento en la activación de ruta de MAPK, pERK, p-p38, y p-JNK, incremento de liberación de factores de transcripción Akt y NF-κB y una superior liberación de citoquinas como TNF-α y IL-1, induciendo muerte celular. Sin embargo, se observó que, en las células tratadas con NAC, se podrían inhibir estas rutas y reducir los ROS, siendo éste un efecto dosis-dependiente. Sin embargo, no sólo existe este estudio para demostrar la eficacia del NAC como agente antioxidante, sino que existen muchos otros. Otro ejemplo, sería un estudio realizado sobre queratinocitos normales (células HaCaT) y de cobaya (GP), por medio del cual, se trató de relacionar el daño sobre la piel provocado por la exposición a cromo hexavalente (31). La exposición a dicho metal tiene un gran interés general, puesto que se relaciona con la aparición de dermatitis de contacto de tipo alérgico, que es considerada una enfermedad ocupacional en los trabajadores de este metal. El cromo hexavalente penetra en la dermis y se transforma en cromo trivalente el cual se une a los queratinocitos de la piel y células inmune, provocando la toxicidad dérmica y desencadenando el mecanismo de hipersensibilidad que conlleva a la enfermedad. En este estudio nombrado, se vio que la toxicidad venía mediada por la activación de las mismas rutas comentadas en el estudio previo y que el pretratamiento con NAC fue capaz de reducir la autofagia, apoptosis, los ROS, la activación de las vías Akt / NF-κB / MAPK y liberación de factores y citoquinas TNF-α / IL-1α *in vivo* e *in vitro* en ambos tipos celulares (queratinocitos normales y cobayas albinas) expuestos al cromo hexavalente, concluyendo que sería efectivo para contrarrestar los efectos de este metal.

Siguiendo con posibles agentes de la reducción del efecto de las NPs, encontramos otros tratamientos. No hay demasiados estudios al respecto, pero la melatonina se postula como uno de ellos, exhibiendo propiedades que la convierten en una molécula mucho más potente que otros antioxidantes como la Vitamina E y C (29). Como muestra de ello, podemos citar un estudio *in vitro* sobre la geno y citotoxicidad en la línea celular NRK renal secundaria a la liberación de NPs de Cobalto relacionada con las prótesis MoM y su comparación con un grupo sometido a dicha exposición, pero tratado previamente con varias dosis de melatonina. Dicho estudio verificó su potencial efecto protector, mostrando una mayor integridad de las membranas celulares y efectos antiapoptóticos al reducir la relación Bax/Bcl-2 y actuar sobre la escisión de la caspasa-3 (también implicada en la apoptosis).

El último tratamiento que se comentará para reducir la toxicidad dependiente de ROS será el de L-AA (30). Un estudio *in vitro* realizado sobre células de ratón 3T3 Balb demostró la toxicidad en estas células asociada a la presencia tanto de NPs de Cobalto como de iones Co^{2+} (siendo superior la toxicidad en las nanopartículas que en los iones). La finalidad del estudio era doble, por un lado, determinar este daño y relacionarlo con la presencia de dichos metales en las cirugías ortopédicas de prótesis MoM, y, por otro lado, estudiar el L-AA como posible tratamiento. La investigación determinó que existen dos vías encargadas de provocar la apoptosis tras esta exposición, la vía intrínseca y extrínseca y que ambas son activadas en presencia de los iones y partículas nano de cobalto. La vía extrínseca induce la activación de las caspasas 8, 9 y 3, mientras que la vía intrínseca se activa por la desregulación del cociente Bax/Bcl-2 (se incrementa Bax pro-apoptótico y se reduce Bcl-2 anti-apoptótico), lo que se traduce en un incremento de la liberación de las proteínas pro-apoptóticas (Heat Shock proteins, citocromo c, Smac/Diablo, endonucleasa G) de la mitocondria al citosol y consecuentemente, se produce la formación de poros en la membrana, inducción de la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina. El estudio también concluyó que el L-AA era capaz de inhibir las dos vías de activación (sobre todo frente al daño de NPs), si bien se ha establecido que puede tener una protección parcial y no total, lo que implica que puede haber otros procesos mediadores de daño que aún no se conocen y que será preciso estudiar.

4. RESULTADOS

4.1. EL COBALTO EN LOS ARTÍCULOS DE CONSUMO

Previamente se nombraron las distintas aplicaciones de los NMs a nivel general en los artículos de consumo e industrias pertenecientes a varios sectores. Sin embargo, en este apartado vamos a referirnos en concreto a los materiales compuestos por cobalto y sus principales utilidades en el mercado. El cobalto se crea como cobalto 59 (un isótopo estable) y a partir de éste, se puede generar cobalto 60, que es un radioisótopo capaz de producir rayos gamma (19). Dentro del campo de la medicina, es fundamental su uso como medio de contraste (junto con otros metales como platino, oro, hierro y grafito) en técnicas de imagen como la resonancia magnética nuclear (RMN) y en tratamientos contra el cáncer por medio de la hipertermia magnética que se basa en la generación de calor a través de un campo magnético para destruir las células tumorales. Su uso en la

industria está muy extendido, siendo el más destacado el empleo en superaleaciones o aleaciones magnéticas (aleaciones electrodepositadas, carburos cementados, Stellite-cromo y cobalto para prótesis dentales, por ejemplo). Asimismo, las sales y óxidos de cobalto sirven para fabricar pigmentos para vidrio y cerámica, aditivos en productos agrícolas y medicamentos, tinta de impresión, catalizadores en industrias del petróleo, cintas magnéticas, recubrimiento y absorbancia de luz, equipos de detección de gases, etc. (14) (16).

No obstante, al igual que se comentó en otro apartado más general, una de sus aplicaciones más relevantes desde el punto de vista biomédico, es la fabricación de implantes para rodilla, hombro y cadera, siendo esta última elaborada fundamentalmente junto al cromo en la artroplastia total/parcial de cadera. Se pueden añadir además otros metales para mejorar sus propiedades mecánicas como tungsteno, níquel o molibdeno (15). La construcción de las prótesis de cadera de metal sobre metal (MoM) a base de NPs cromo-cobalto o cobalto (primordial para este trabajo) supuso un cambio en el mundo de los implantes y su finalidad era la de reducir el proceso de aflojamiento aséptico generado por las prótesis tradicionales de polietileno, controvertido puesto que aunque las de metal tienen menor desgaste volumétrico que las de polietileno, las MoM pueden generar más partículas pequeñas que terminen por arruinar la operación) (18).

Las principales indicaciones en el uso de estos implantes a base de cobalto son: reducción del dolor, mejora de la funcionalidad, actividad y calidad de vida en aquellos pacientes que sufrieron o bien una fractura de cuello femoral o un daño articular severo, o aquellos que necesitan un recambio de una prótesis fallida (28). Para lograr estos objetivos, ajustándose al nivel de daño que presente el paciente, existen varios modelos de implantes, algunos persiguen recambios totales de la cabeza femoral y otros solamente buscan ser recubrimientos parciales de zócalo y bola y ambas cirugías se pueden realizar con tres tipos básicos de prótesis, Prótesis de Cerámica sobre cerámica (CoC), Prótesis de Metal sobre Metal (MoM) y Prótesis de Metal sobre polietileno reticulado (MoP), siendo más duraderas las que no tienen polietileno (20). A su vez, los componentes no móviles de estas prótesis son aleaciones de titanio, cromo-cobalto o acero inoxidable, todos ellos mezclados con otros materiales en menor cantidad) y las superficies de apoyo son las nombradas anteriormente (cromo-cobalto, polietileno, cerámica o acero inoxidable).

4.2. TOXICIDAD PRODUCIDA POR LA EXPOSICIÓN A NANOPARTÍCULAS DE COBALTO

En este apartado nos centraremos en las partículas de cobalto (NPs, iones) y sus repercusiones sobre el ser humano (principalmente la genotoxicidad, carcinogénesis, toxicidad sistémica y local). Asimismo, se procederá a comparar los efectos producidos por CoNPs sobre las personas con los efectos provocados por el cobalto y otras NPs sobre las mismas. Por último, se contemplará específicamente la toxicidad humana ejercida por las CoNPs liberadas de las distintas prótesis (fundamentalmente de prótesis de cadera).

4.2.1. COBALTO: GENOTOXICIDAD Y DAÑO OXIDATIVO

Antes de abordar los compuestos en tamaño nano, es necesario insistir de nuevo, en las diferencias en toxicidad en el cobalto soluble o poco soluble, pero en su tamaño a mayor escala. En concreto, se puede hacer referencia a una revisión de trabajos en donde se estudia la genotoxicidad de estas partículas y las diferencias respecto a los efectos de unos y otros elementos según sus características (14). Los autores de este trabajo aportan estudios *in vivo* e *in vitro* tanto a favor como en contra del daño oxidativo sobre el DNA, es por ello por lo que, de esta revisión, no se puede extraer una opinión firme que apoye ninguno de los dos extremos. El análisis se realizó utilizando los compuestos solubles de cobalto (sulfato y cloruro) y el propio metal de cobalto sobre el DNA de bacterias, sobre células de mamíferos (*in vitro*), sobre células somáticas y germinales (*in vivo*), así como sobre seres humanos en exposiciones ocupacionales. Así pues, sí que podemos afirmar que, algunos de los ensayos estudiados en la revisión a la que se hace referencia, sí que asociaron mutagénesis de los compuestos de cobalto en bacterias (E.Coli y Salmonela) y sobre mamíferos (células de hámster y ratón), aunque algunos sólo relacionados con el cloruro de cobalto y no con otros compuestos. Sin embargo, se mencionan otros estudios que ponen de manifiesto que los efectos genotóxicos no son evidentes, por ejemplo, se expone un trabajo realizado sobre seres humanos (trabajadores de refinerías y plantas de producción de metal duro expuestos a polvo de cobalto) en donde no se pudo establecer ninguna diferencia significativa en los resultados del grupo de exposición (casos) y el de trabajadores no expuestos (controles).

4.2.2. LAS NANOPARTÍCULAS DE COBALTO

A) GENOTOXICIDAD, ESTRÉS OXIDATIVO Y CARCINOGENÉISIS

El auge de las CoNPs en muchas aplicaciones de las ciencias de la salud y biomédicas, se debe, en gran parte, a que su fabricación depende de un proceso sencillo y económico consistente en un paso hidrotermal con un recubrimiento oleico, sin necesitar temperaturas de procesamiento mayores (24). Las propiedades intrínsecas de las CoNPs (magnéticas, fisicoquímicas y estructurales) han sido bien estudiadas, así como sus efectos secundarios (seguridad y citotoxicidad) por medio, entre otros, de técnicas tales como espectrometría de Raman, de infrarrojos y difracción de rayos X. De este modo, estaría justificado su uso en el campo de la medicina en base a dos hechos relacionados con la citotoxicidad de NPs: primero, su naturaleza antiproliferativa frente a células cancerosas y segundo, su inocuidad sobre las células humanas normales.

La toxicidad sobre el DNA en términos de transformación celular, generación de ROS y estrés oxidativo en la exposición a CoNPs o aleaciones de cobalto ya había sido demostrada *in vitro* anteriormente. Revisiones más actuales, han tratado de obtener resultados positivos que demuestren esta relación por medio de ensayos *in vivo* (16). En particular, se ha podido demostrar *in vivo* estrés oxidativo, inflamación pulmonar (siendo mayor con CoNPs que los daños provocados por partículas de cobalto de otro tamaño), proliferación celular y mutación del DNA sobre ratones transgénicos delta GPT (ratones que transportan alrededor de 80 copias del transgén ADN lambda EG10 en cada

cromosoma 17). Algunas de las pruebas realizadas y sus resultados se detallan en (FIGURA 12), (FIGURA 13), (FIGURA 14) y (FIGURA 15). En relación con la temporalidad, la proliferación se elevó significativamente tras los siete primeros días de tratamiento (Fase Aguda), y pese a que volvió a disminuir a partir del cuarto mes (Fase Crónica), se mantuvo más elevada de nuevo posteriormente.

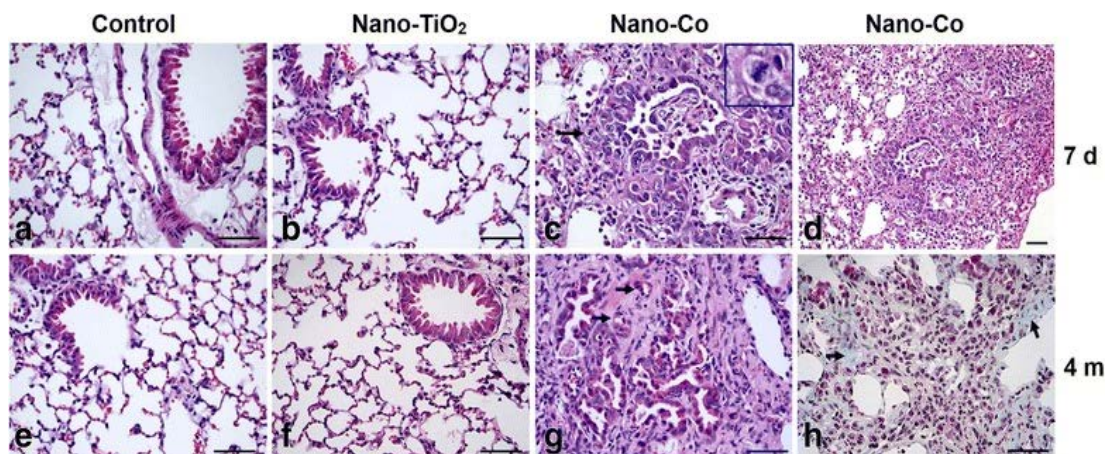


Figura 12. Tinción con H&E. Cambios histológicos en los pulmones de ratones 7 días y 4 meses después de la exposición a NPs metálicas. Las secciones de pulmón recogidas de ratones 7 días (a - d) y 4 meses (e - h) después de la exposición se analizaron mediante tinción con H&E (a - g) o tinción con tricromo (h). La flecha en (c) muestra una célula epitelial alveolar hiperplásica mitótica. La flecha en (g) muestra fibrosis intersticial extensa y bronquiolización. La (h) muestra una mayor deposición de colágeno (tinción azul) en los tabiques alveolares por tinción tricrómica. Nano-TiO no causó estos efectos (b & f). (16)

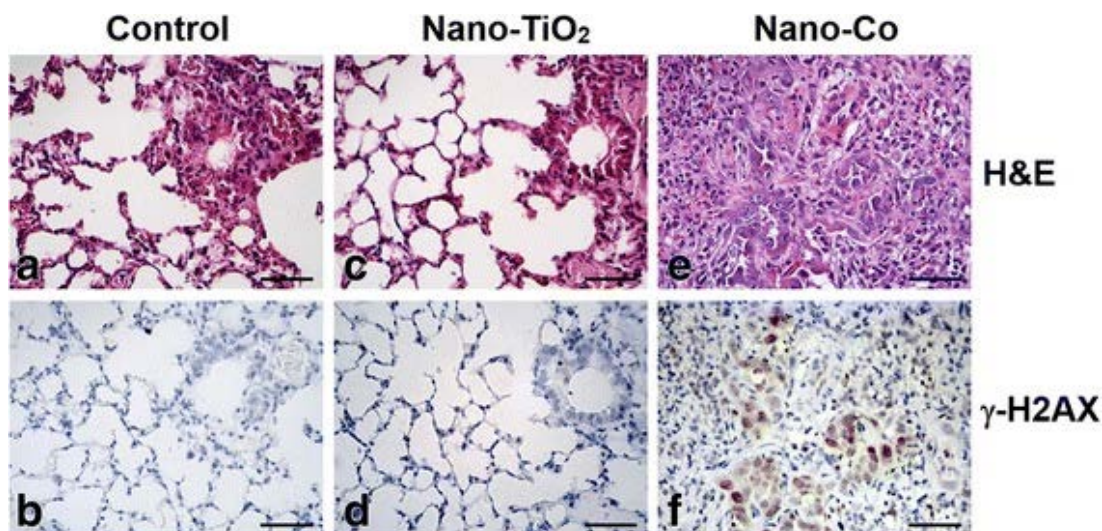


Figura 13. Tinción inmunohistoquímica con Ki-67, PCNA. Aumento de la expresión de Ki-67 y PCNA en pulmones de ratón después de la exposición a CoNPs. Los ratones fueron instilados intratraquealmente con 50 µg por ratón de Nano-Co o Nano-TiO 2. Los ratones de control fueron instilados con solución salina fisiológica. Las secciones de pulmón recogidas de ratones 7 días (a - i) y 4 meses (j - l) después de la exposición se analizaron mediante tinción inmunohistoquímica. (16)

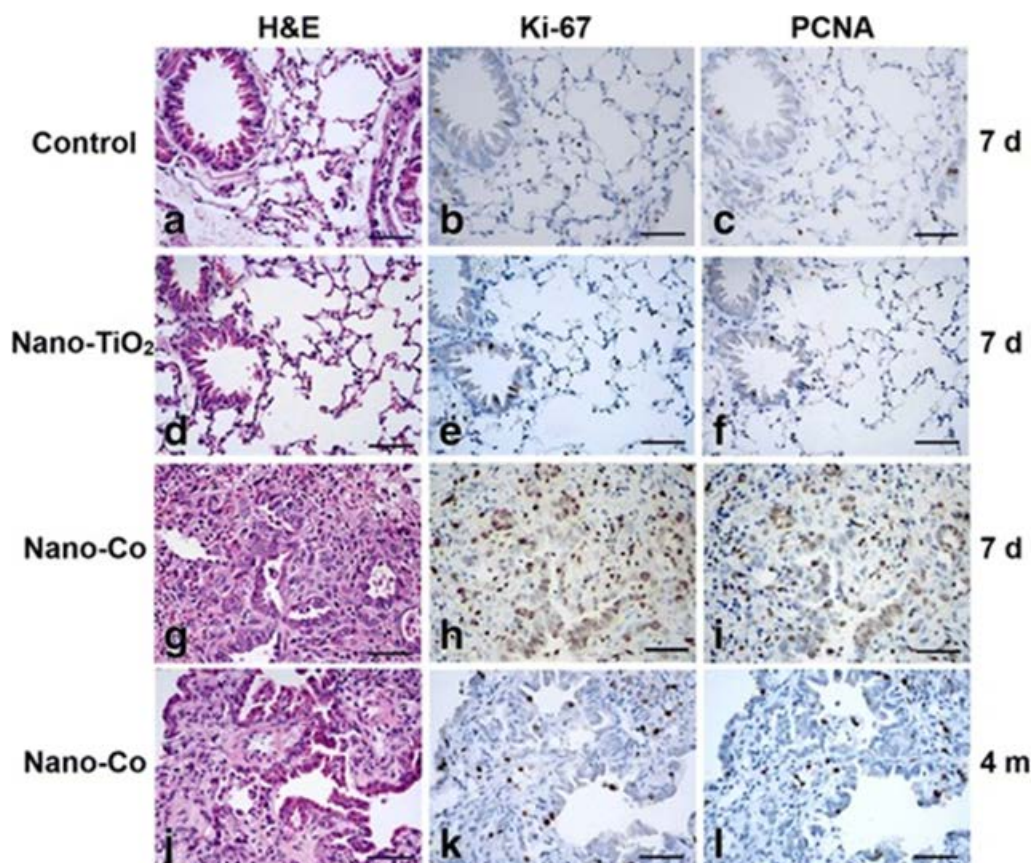


Figura 14. Tinción γ -H2AX. Aumento de la inmunotinción de γ -H2AX en pulmones de ratón 7 días después de la exposición a Nano-Co. Los ratones fueron instilados intratraquealmente con 50 μ g por ratón de Nano-Co o Nano-TiO₂. Los ratones de control fueron instilados con solución salina fisiológica. Los tejidos pulmonares recogidos de ratones 7 días después de la exposición se analizaron mediante tinción con H&E (a, c, e) y tinción con inmunohistoquímica γ -H2AX (b, d, f). (16)

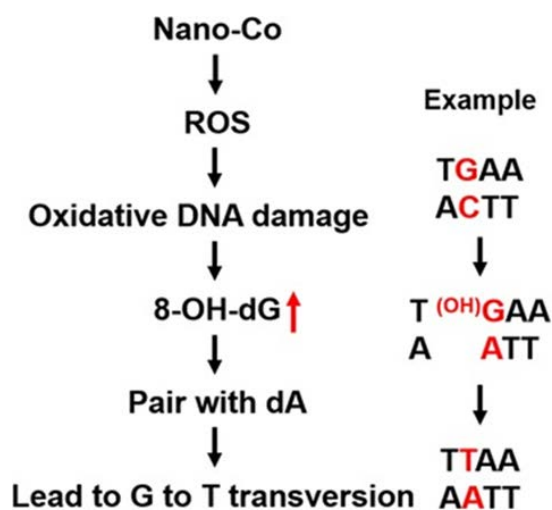


Figura 15. Un diagrama esquemático de las vías que pueden estar involucradas en la mutación de ADN inducida por CoNPs. Nano-Co causó estrés oxidativo en el ADN y una mayor formación de 8-OH-dG. 8-OHdG, lo que lleva a la transversión de G: C a T: A). (16)

Siguiendo con la misma idea, otros trabajos también han valorado la genotoxicidad (en concreto la transformación celular) en el tiempo y en exposición a distintas dosis de NPs (17). El estudio de exposición de CoNPs sobre líneas celulares de fibroblastos embrionarios de ratón de tipo salvaje (MEF Ogg1 + / +) y su forma isogénica Knockout (MEF Ogg1 /) pone de manifiesto estos efectos y sus variaciones ligadas al tiempo y la citotoxicidad relacionada con el gen Ogg1. Pues bien, a corto plazo, las células de fenotipo Knockout son en torno a veinte veces más sensibles en cuanto a viabilidad celular que las de tipo salvaje y, a largo plazo, en los dos fenotipos se demostró la internalización de NPs en vacuolas de nano-agregados y la síntesis de ROS (siendo superior para el fenotipo MEF Ogg1 /). Pero sólo se observó a largo plazo en el tipo Knockout cambios en el RNAm de diversos genes y la morfología típica del cáncer. La conclusión principal obtenida de este estudio es que el gen Ogg1 es imprescindible para mantener la integridad genómica reparando las lesiones del DNA tras el estrés oxidativo.

Para demostrar en mayor profundidad la genotoxicidad y carcinogénesis de CoNPs, se han llevado a cabo otros estudios (*in vitro* e *in vivo* sobre ratas y ratones) comparando sus efectos sobre el ser humano con el daño provocado por la exposición a otras NPs como las de Níquel y Cromo. La finalidad de estos estudios es valorar si el perjuicio sobre el individuo es igual sólo por el hecho de tratarse de NPs con independencia de su material de origen o, por el contrario, si existe una menor o mayor agresión del cobalto en particular respecto a otros elementos en su mismo tamaño (19). En los ensayos *in vitro* se observó que las tres NPs se relacionaban con genotoxicidad, siendo muy relevante en el nano-cobalto y se expone la idea de que la genotoxicidad por CoNPs sería consecuencia de la internalización de estas partículas en los leucocitos humanos, dañando el sistema reticuloendotelial. Otros hallazgos *in vitro* en la revisión citada apuntan que el daño genotóxico resultó en rupturas de DNA, aparición de células micro y binucleadas, duplicaciones, deleciones y tetraploidía y concluyen que los procesos neoplásicos surgirían por factores epigenéticos y la aparición de un ambiente inflamatorio cerca de los tumores (formación de coágulos e incremento de células de tipo inflamatorio a nivel local). Pese a que son menos los ensayos *in vivo*, cabe destacar un estudio (en esta misma revisión nombrada) sobre ratas expuestas a CoNPs y ratas control (expuestas a partículas finas de cobalto), constatándose tras la instilación de partículas, la presencia de fibrosis en las ratas control y tumores mesenquimales malignos en las otras.

B) ENFERMEDAD PULMONAR

La exposición ocupacional a ENM cobra especial relevancia en las industrias de perforación, minería y fabricación de metal duro. Se han revisado trabajos *in vivo* e *in vitro* sobre células y animales con el fin de estudiar los efectos de la inhalación de polvo de NPs de WC-Co (carburo de tungsteno-cobalto), establecer su relación con la enfermedad pulmonar y definir los límites seguros de exposición para los trabajadores del metal (32). Hoy en día, se sabe que la inhalación de WC-Co se relaciona con la aparición de HMLD (*Hard Metal Lung Disease*), cuyos síntomas (dificultad para respirar, capacidad pulmonar reducida, inflamación pulmonar progresiva y fibrosis eventual) son inespecíficos y también aparecen en otras enfermedades respiratorias y cuyo diagnóstico, es complicado

en el presente por falta de herramientas definitivas. También se sabe que (la inhalación de estas NPs) se correlaciona con asma ocupacional y la presencia de un progresivo estado inflamatorio relacionado con un mayor riesgo potencial de padecer cáncer pulmonar, (aunque los mecanismos subyacentes que encaminan a esta progresión son poco conocidos).

Sin embargo, la HMLD no se asocia a NPs de cobalto aisladas, sino a la combinación (WC-Co) y (aunque no existen actualmente técnicas diagnósticas que faciliten su identificación), se sabe que la característica definitoria de la enfermedad es la presencia en biopsias pulmonares de complejos de células multinucleadas gigantes originadas a partir de macrófagos que fagocitan dichas partículas y desencadenan todos los procesos inflamatorios. Existen hipótesis (no demostradas *in vivo* hasta la fecha), que vincularían la HMLD a pacientes más predispuestos genéticamente a tenerla, siendo estos sujetos (según esta teoría), más propensos a desarrollar cáncer de pulmón en un futuro. La explicación de este fenómeno sería la aparición de una acción sinérgica entre los iones de cobalto (inhibiendo los mecanismos de reparación del DNA) y la generación de ROS por parte del WC-Co (causando un daño directo sobre el DNA).

C) PRÓTESIS Y NANOPARTÍCULAS DE COBALTO

Puesto que las CoNPs y las NPs de cromo-cobalto utilizadas en la fabricación de prótesis son una de las principales fuentes de toxicidad actualmente en el ser humano (dada la demanda creciente de estas cirugías en una población muy envejecida), a continuación, se procederá a analizar las repercusiones que estos dispositivos y sus NPs pueden acarrear en las personas. Todo ello se expondrá en los siguientes apartados: **Genotoxicidad, carcinogénesis e inflamación; reacciones de hipersensibilidad; toxicidad sistémica** (neurológica, cardíaca y tiroidea) y **comparativa entre prótesis**.

– GENOTOXICIDAD, CARCINOGENESIS E INFLAMACIÓN

Para continuar con los párrafos previos más generales, analizaremos en primer orden, los daños a nivel del DNA y la inflamación, pero en presencia de prótesis de CoNPs y sus distintas aleaciones. Varios son los estudios al respecto, como ejemplo, se puede nombrar uno *in vitro* realizado sobre fibroblastos humanos en el que se sugiere que el daño celular y sobre el DNA es dependiente del tamaño de las partículas procedentes de las aleaciones de cromo-cobalto de los implantes (siendo superior el daño provocado por NPs en comparación con las de tamaño micro) y también, en este trabajo, se sugiere que podría ser una respuesta distinta esta estirpe celular (fibroblastos) que la respuesta en otras células (18). Los efectos biológicos se midieron en términos de radicales libres, daño del DNA y liberación de citoquinas después de la exposición de los fibroblastos humanos a diversas dosis de los dos tamaños de partículas. En términos generales, se puede afirmar que, (en el mencionado estudio sobre fibroblastos), las NPs generan más daño que sus homólogas en tamaño micro, En particular, se puede destacar que las NPs provocaron cuatro veces más daño estadísticamente significativo que las micropartículas tras 24 horas de exposición para las dosis más elevadas, aunque no se pudo valorar su efecto tras 5 días.

En otra revisión realizada con el fin de evaluar estos efectos, se ha establecido que la diferencia entre el potencial genotóxico de las partículas micro y nano de cromo-cobalto en prótesis metálicas puede deberse, en gran parte, a su absorción celular diferente y distinta localización intracelular post absorción (15). Dentro de esta misma revisión, se estudió la carcinogénesis mencionando un trabajo en donde el implante por varias vías (intratorácica, intraperitoneal, intramuscular, intrafemoral y subcutánea) de distintas dosis de partículas nano y micro de cromo, cobalto y cromo-cobalto en diversos animales experimentales (ratones y conejos), resultó en un significativo incremento de tumores locales en el sitio de inyección, si bien es verdad que, en pocos casos, se observaron tumores sistémicos como resultado de metástasis del sitio de inyección.

Otros estudios al respecto se centraron en probar *in vivo* la interacción de NPs de cromo-cobalto (liberadas de las prótesis) sobre la morfología, proliferación, toxicidad celular y la liberación de citoquinas, así como demostrar su potenciación actuando en sinergia con iones de cobalto (21). Para ello, se seleccionaron monocitos de la línea celular U937 (estirpe celular humana monocítica derivada de linfoma) y se pretrataron con iones de cobalto, para 4 días después exponerlas a los NPs de cromo-cobalto procedentes de los residuos de desgaste de prótesis metálicas. Con este experimento, se trató de demostrar tres hechos: primero, la existencia *in vivo* de una activación de los monocitos y liberación de citocinas en presencia de NPs; segundo, determinar si esta activación también se producía por la presencia previa de iones de cobalto y, por último, observar si esta activación era superior por la sinergia de los dos componentes (NPs e iones). Los resultados concluyeron que la sinergia de ambos tipos (NPs e iones) favorece los procesos de osteólisis *in vivo* por sus propios mecanismos de toxicidad individual y por la sensibilización previa de los monocitos U937 a la exposición de iones de cobalto, poniendo en peligro la supervivencia de la prótesis.

Por último, en un ensayo prospectivo se estudió, de modo paralelo, el efecto genotóxico sobre el ser humano tras dos años del implante de prótesis de cadera de tipo MoM y MoP compuestas por NPs de cromo-cobalto o cobalto (26). El análisis citogenético de este estudio demostró un aumento en los niveles de cromo y cobalto (6 a 7 veces más), una mayor incidencia de translocaciones cromosómicas (1,5 veces más) y aneuploidía (de 2 a 4 veces más) en la sangre periférica de los pacientes tras el implante en comparación con los valores preoperatorios (siendo incrementos en menor cuantía que los resultantes en el estudio de MoP). Aunque no se puede explicar de un modo contundente los hallazgos mostrados en el estudio, ni se contemplan los posibles efectos a largo plazo de estos resultados.

– REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD

En segundo lugar, podemos nombrar el efecto de hipersensibilidad observado en determinados estudios. Respecto a este punto, tenemos datos de estudios realizados sobre ratones cuya finalidad fue la evaluación de las reacciones adversas de NPs de cromo-cobalto en los sitios de inyección y a distancia, tanto en fase semi-aguda como a largo plazo y la realización de una comparativa entre el efecto producido por dichas partículas en tamaño nano y sus homólogas en escala micrométrica (22). Para ello, se valoraron ciertos aspectos como los

cambios histológicos en tejidos de rodilla, ganglios linfáticos y los criterios inmunológicos. El tejido periarticular no mostró a penas respuesta inflamatoria a las cuatro semanas después de la inyección de partículas, y los animales no mostraron reacción inflamatoria en la rodilla después de 40 semanas, sin embargo, la histología de los ganglios de ratones expuestos a micro y NPs de cromo-cobalto, demostró la presencia de colecciones de macrófagos con fibrosis. Aunque los dos metales en ambos tamaños podrían provocar una reacción de hipersensibilidad de tipo IV (por su capacidad para actuar como haptenos), los datos indicaron que los ratones expuestos a partículas de tamaño micrométrico desarrollaron una respuesta superior que las partículas nano (*FIGURA 16*). No se conoce realmente la causa, pero se postula la idea de que las partículas de tamaño nanométrico (precisamente por su tamaño), podrían escapar de la fagocitosis activa por los macrófagos, permitiendo su entrada en cualquier célula a través de otros mecanismos de captación celular y evitando desencadenar la respuesta inmune. Lo principales cambios fueron a nivel periarticular y consistieron en procesos de tipo inflamatorio ALVAL (Vasculitis linfocítica aséptica-asociada a lesión) en asociación con necrosis tisular, fenómenos de hipersensibilidad y pseudotumores.

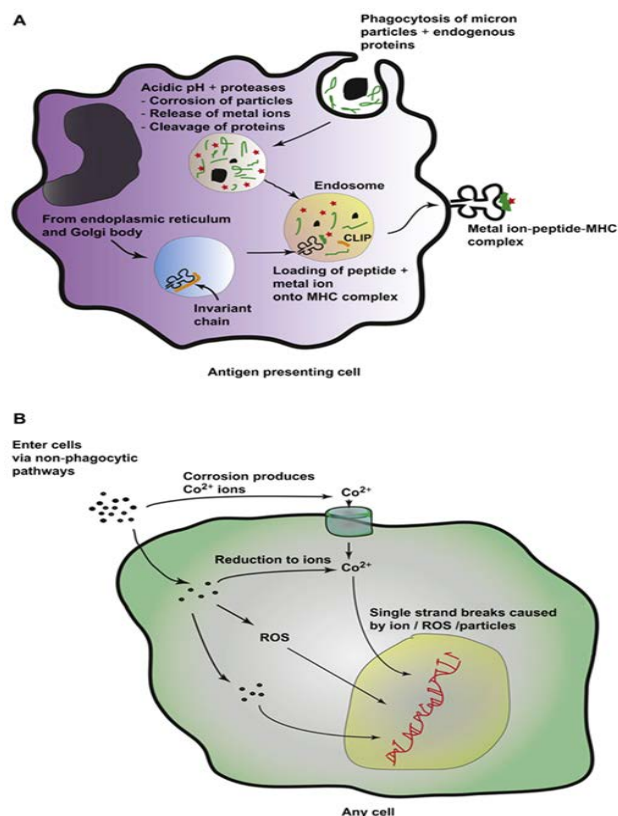


Figura 16. Vías hipotéticas diferentes por las partículas de CoCr de tamaño nanométrico (A) y micrométrico (B) entran en las células y su posterior efecto. (22)

– TOXICIDAD SISTÉMICA

En tercer lugar, es muy importante valorar la toxicidad de CoNPs y las aleaciones de nano cromo-cobalto en diversos órganos a distancia del sitio de implantación del material protésico. Si bien parece establecido el hecho de que la toxicidad sistémica post-artroplastia no es tan frecuente como se sospechaba y son muy

pocos los casos que han reportado una mortalidad por el cobalto, no se deben olvidar los riesgos potenciales asociados a prótesis metálicas e intervenir sin dilación si es necesario. Se ha consultado una revisión muy interesante de 18 pacientes o casos que fueron sometidos a reintervenciones de cadera por ruptura o desgaste del cojinete de cerámica de su primer de su primer implante, siendo éste sustituido quirúrgicamente por otras estructuras más modernas de tipo MoM o CoM con base de CoNPs o NPs cromo-cobalto (20). A modo de idea global, dicho estudio parece indicar que la liberación de NPs de cobalto o cromo-cobalto puede provocar una reacción a nivel local y metalosis (necrosis y ennegrecimiento de la zona periprotésica) o una reacción a nivel sistémico afectando a diversos órganos. Estos acontecimientos se podrían observar desde el primer mes (pero sobre todo durante el primer año) post quirúrgico y los síntomas podrían desaparecer o aminorarse tras la retirada del implante. Los efectos más notables son la aparición de patologías nivel neurológico (neuropatía periférica, toxicidad ocular, pérdida de audición neurosensorial y deterioro cognitivo), cardíaco (disfunción sistólica global, diastólica, derrame pericárdico y miocardiopatía dilatada) y en el tiroides (hipotiroidismo posterior a la colocación de los dispositivos de NPs de estos elementos). Pese a todos estos eventos encontrados, el estudio de los casos avisa de la posibilidad de existencia de muchos factores de confusión (como patologías previas a la intervención), que dificultarían la extracción de las conclusiones oportunas.

A fin de apuntalar la idea de la toxicidad a distancia de las NPs de cobalto en prótesis y fallos protésicos MoM y, (más aún CoM), se puede nombrar otro trabajo consistente en una única revisión de un caso de una señora de 60 años con un antecedente de artroplastia total de cadera que sufrió una fractura de los componentes cerámicos de su prótesis y una metalosis de la articulación, requiriendo posteriormente una sinovectomía y sustitución del implante por otro de tipo MoP (25). La paciente de este estudio comenzó a notar síntomas inespecíficos diez meses después de la revisión de su prótesis y, tras varios ingresos de urgencia, finalmente falleció por un shock cardiogénico sumado a una insuficiencia respiratoria. La necropsia practicada confirmó que la muerte fue propiciada por el cobalto que apareció tanto en la cadera como en el tejido cardíaco. Este trabajo avisa de la necesidad de medir las cifras del cromo y cobalto en sangre y orina postquirúrgicas (no demostrando un superior beneficio en la población general, pero sí en la que tiene complicaciones protésicas) y monitorizarlas periódicamente, así como de vigilar los posibles síntomas asociados a toxicidad por cobalto o cromo en las personas receptoras de un recambio de prótesis de los tipos mencionados. Del mismo modo, el trabajo aconseja a los profesionales sanitarios (médicos y cirujanos) realizar una remoción quirúrgica del implante si se observan

– COMPARATIVA ENTRE PRÓTESIS DE CADERA

Para concluir, valoraremos la repercusión de la toxicidad de CoNPs en la supervivencia del implante, los tipos de prótesis con menor o mayor tasa de fallos y cuáles pueden ser las futuras recomendaciones al respecto. En la actualidad, la artroplastia de cadera es una cirugía en continuo crecimiento por una excesiva población de personas de edad avanzada. Todo ello genera un enorme impacto sanitario y económico alrededor de dicha cirugía y obliga a impulsar mejoras en las técnicas y los materiales de implante para evitar complicaciones, reducir la

necesidad de cirugías de revisión y, finalmente, aminorar los costes sanitarios a medio y largo plazo. En este sentido, pasaremos a comentar una revisión *in vivo* de pacientes sometidos a cirugías de recambio de cadera como consecuencia de la aparición de ALTR (Reacción adversa del tejido local) (23). En los últimos años, se ha reportado un incremento de ALTR en las cirugías de rejuvenecimiento y artroplastias totales de cadera, en concreto son tres tipos de implantes los que se asocian a dicho fenómeno: MoM HRA (Artroplastia de resuperficialización de cadera metal-metal), MoM LHTHA (Artroplastia total de cadera de metal sobre metal de cabeza grande) y Non-MoM DMNTHA (Artroplastia total de cadera no metal-metal de doble cuello modular). Las aleaciones de NPs cromo-cobalto son las más utilizadas y relacionadas con la patología de desgaste del implante. El estudio se basó en un exhaustivo análisis de las NPs desde un punto de vista histológico, toxicológico y por medio de microscopía electrónica, a fin de comprender los fenómenos inflamatorios e inmunogénicos (y su inicio y severidad). La revisión presenta algunas limitaciones importantes que se deben tener en cuenta para valorar los resultados (los tejidos analizados fueron sólo recogidos en el momento de revisión; no obtención de información de NPs para su asociación con los componentes proteicos desencadenantes de la reacción inmunológica; imposibilidad de distinguir entre desgaste primario de NPs o desgaste de partículas secundarias fagocitadas), pero también muestra diferencias significativas entre los diversos tipos de prótesis. En general, los resultados del estudio concluyeron que las prótesis no MoM DMNTHA se acompañan de reacciones más severas en comparación con ambos grupos MoM, ya que el primero, tiene niveles más elevados de partículas más complejas pese a que tiene menos carga total de partículas. El estudio informa de que es más importante las características y distribución de las partículas en el implante que la carga total de partículas presentes en la aparición de eventos adversos asociados. Asimismo, se concluye que el MoM HRA se asocia con menos toxicidad e inmunogenicidad que el MoM LHTHA.

4.3. PREVENCIÓN

Con el fin de reducir la toxicidad al máximo tanto en el presente como sobre todo en un futuro inmediato, se revisan continuamente parámetros relacionados con la medición de NPs existentes en los materiales, la cantidad de éstas que son eliminadas al medio ambiente, las normativas que regulan el trabajo con dichas partículas y las posibles estrategias de protección si nos exponemos a ellas.

A lo largo del tiempo, se han ido eliminando los errores en los conceptos y modificando la legislación según se iba avanzando en el conocimiento de la nanotecnología. Los primeros errores que han conllevado limitaciones en la legislación son el de considerar que los NMs tienen exactamente la misma equivalencia que sus homólogos de mayor tamaño (sabemos que tienen unas propiedades únicas en base a sus características) y utilizar legislaciones basadas en umbrales, puesto que el tamaño ínfimo de estas partículas quedaría por debajo de éstos y no serían susceptibles de ser reguladas (3).

Como buena nota de estas nuevas consideraciones reglamentarias, se han ido creando normativas en distintos sectores dedicados a la producción de materiales elaborados con esta tecnología y se han impulsado proyectos para evaluar los riesgos. Por ejemplo, el Proyecto LIFE REACHnano financiado por la Comisión Europea y en donde han participado, entre otros, el Instituto Valenciano de Seguridad y Salud en el Trabajo. Otro ejemplo, aplicado al sector del bienestar, fue la impulsión de la UE (desde 2013) de un Reglamento de Cosméticos que obligaba a escribir la palabra nano al lado de la partícula en la etiqueta del producto. Dentro del sector alimentario, la UE también tiene sus propias disposiciones al respecto. Así pues, la guía REACH para los “Requisitos de Información y Evaluación de la Seguridad” ya incluye los NMs desde 2012 (5) y en 2015 se ha aprobado un Reglamento 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo Europeo en el que se consideran nuevos alimentos los que tienen NMs. Por su parte, en la industria alimentaria, existen reglamentos dedicados en exclusiva a los NMs como la Guía EFSA del 2011, la cual no es vinculante dentro del marco legal, que recoge todos los riesgos y métodos de caracterización de las propiedades de cualquier sustancia alimentaria que contenga nanotecnología o reglamentos sobre el tipo de registro y etiquetado de los productos. Según estas últimas normativas se obliga, al igual que en el sector de la cosmética, a poner la palabra nano en la etiqueta junto al ingrediente. Existe también la obligación de tener un inventario con todos estos productos que contengan NMs y que tengan potenciales riesgos. Incluso es preciso notificar obligatoriamente la introducción de estos productos a varios Estados miembros de la UE.

Dentro del marco legislativo español, además de todas las normativas impuestas por la UE, la Constitución Española encomienda a los poderes públicos vigilar por la seguridad e higiene en el trabajo. A nivel general, la exposición ocupacional a determinados materiales se regula por la Ley 31/1995 del 8 de noviembre de Ley de Prevención de Riesgos Laborales, junto con la Ley 54/2003 del 12 de diciembre y El Real Decreto 374/2001 del 6 de abril sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos (11). Además de todos estos reglamentos y normativas nacionales e internacionales, se han elaborado numerosas recomendaciones específicas a los NMs para reducir el riesgo ocupacional y garantizar la protección del trabajador expuesto. Éstas se pueden dividir en medidas técnicas, organizativas y equipos de protección individual. Respecto a las primeras, algunas de las recomendaciones básicas serían: determinar la cantidad de materia (masa/nº partículas), el tiempo de exposición, el grado de humedad (mejor en suspensión líquida que en polvo), reducir las fugas, trabajar con el menor número de partículas, aislar el proceso de producción y si no se puede, utilizar sistemas de extracción con filtros SULPA, ULPA y HEPA, entre otras medidas. Las recomendaciones de tipo organizativo se centran en gran parte en la higiene en el trabajo, limitación del tiempo de exposición, señalización de las zonas de riesgo, informar sobre los riesgos a los trabajadores y establecer protocolos de actuación si se produce un vertido accidental. Los equipos de protección para el manejo de los NMs son sugeridos en el informe del Proyecto Europeo Integrado en el Sexto Marco (PM6) *Nanosafe*, en 2008, que establece la necesidad de adoptar una protección ocular. Si son NMs sólidos uso de gafas con montura universal, si son líquidos una pantalla facial, en el caso de aerosoles se haría uso de una máscara completa. Para la protección cutánea, se

recomienda el uso de guantes de vinilo de doble capa y trajes de polietileno, mientras que, para la protección de las vías respiratorias, sería preciso verificar si las mascarillas son estancas y utilizar los que tengan filtros fibrosos, fibra de vidrio o de celulosa.

Dejando a un lado las disposiciones legales, sobre todo dirigidas a la protección del ser humano, también es imprescindible no olvidarnos de los riesgos medioambientales. Por ello, se recomienda implementar los sistemas de gestión de residuos, clasificándolos, introduciéndolos en contenedores con doble sellado, etiquetados y en la proximidad de las zonas de producción de dichos residuos, gestionar su recogida y retirada, etc.

Al principio del apartado de prevención se mencionaba que otra de las limitaciones que nos encontrábamos y que se está tratando de perfeccionar es la de las determinaciones analíticas de las fracciones de NPs presentes en los productos (8). Para optimizar estos cálculos, se determinan también los NMs que terminan en aguas residuales y plantas de tratamiento de dichas aguas. Pese a que existen varios modelos de determinación, el SP-ICPMS (*Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) representa un modelo válido y relativamente novedoso para el cálculo los óxidos de metal o metales de NPs en medios acuosos. También, aunque es preciso diseñar nuevas técnicas más precisas, actualmente se utiliza el microscopio electrónico de *scanning* y de transmisión para cuantificar la presencia y concentración de diversos metales preciosos y partículas metálicas de escala nano en bio-sólidos de las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Para concluir con este apartado, se podría establecer una nueva hipótesis o línea de investigación sobre otros aspectos que podrían relacionarse con la toxicidad de los metales y cuyo control podría ser útil para prevenir sus efectos perjudiciales en el organismo del ser humano. Existen estudios que relacionan niveles elevados de Vitamina D3 (> 150 nmol/L) con una mayor absorción de metales (aluminio, cadmio, cobalto y plomo, isótopos radiactivos) y posible toxicidad orgánica secundaria a dicha absorción (33). Estos estudios se consideran un tanto controvertidos y requieren de mucha más investigación al respecto y sobre todo necesitan esclarecer ciertas incógnitas, tales como: si realmente la toxicidad sólo depende de los niveles de vitamina D3 o si actúan otros factores sinérgicamente; si sólo se debe a los niveles de Vitamina D3 o si influye una mayor contaminación ambiental que incremente la exposición y absorción a estos metales con independencia o no de unos niveles superiores de Vitamina D3 en el organismo o si no disponemos actualmente de monitorizaciones correctas para valorar en sangre y orina los elementos tóxicos, ya que éstos se pueden acumular en los tejidos y pueden no detectarse correctamente en mediciones de sangre y orina. Tampoco en estos estudios se nombra si la relación entre los niveles de Vitamina D3 y los metales en el organismo puede suceder en la exposición a NPs metálicas o sólo surge por absorción de moléculas de mayor tamaño. En cualquier caso, parece que la optimización de los valores de Vitamina D3 puede ser una línea de investigación interesante en la prevención de la toxicidad de los metales.

5. DISCUSIÓN

Al tratarse de unos materiales nuevos se han generado múltiples definiciones (1,3,4), que se están concretando mediante conferencias internacionales de consenso con el fin de encontrar una única que sirva como referencia. Del mismo modo, por el momento, no hallamos tampoco ese punto de encuentro en la clasificación de NPs, existiendo un gran número de ellas (3,4,7,11).

La entrada de estas NPs en el organismo parece bien documentada en el aparato respiratorio, a través del epitelio pulmonar y en GIT por mecanismos de absorción paracelular o transcelular (6), posteriormente pasando a la circulación y llegando a los órganos diana. En cambio, sigue existiendo discusión sobre su paso a través de la piel, aunque lo más constatado hasta la fecha es su absorción por el estrato córneo sobre todo cuando la piel se flexiona.

Un hecho en el que sí se ha encontrado consenso, es la existencia de mayor riesgo asociado a las partículas nano respecto a sus homólogas de tamaño superior, no sólo por sus dimensiones y mayor capacidad de penetración en el organismo, sino también por sus propiedades físico-químicas. Por este motivo los Organismos (5) (tanto nacionales como internacionales) se han preocupado por la seguridad de NPs dictando normativas de uso y prevención en los distintos campos de utilización. Dichas normas están sujetas a cambios en función del avance de los conocimientos.

En principio hay que ponerse de acuerdo en cuanto a los métodos más precisos de identificación (5) de estas NPs en los materiales que se van a utilizar, es decir, si son de tipo de imagen, de separación, técnicas espectroscópicas, o la utilización conjunta de todas ellas. Una vez identificado el método idóneo, es preciso conocer los procesos cinéticos de las NPs que ocurren en el organismo, fundamentalmente para conocer su liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción y poder establecer su posible acumulación en órganos diana y su tiempo de permanencia en los mismos. Con el fin de establecer un análisis de las partículas, es necesario precisar su toxicidad, mediante métodos *in vitro* e *in vivo*. Se han desarrollado numerosos estudios *in vitro* para ver su potencial daño oxidativo del DNA, su genotoxicidad y los descensos de la viabilidad celular. En este punto se han encontrado muchas dificultades para poder interpretar correctamente los resultados, aunque existan datos demostrados sobre acciones directas citotóxicas y genotóxicas de NPs de plata en células tumorales humanas de hepatoma y leucemia y células normales de piel y pulmón, (existiendo otros muchos ejemplos de otras NPs).

Uno de los problemas principales que nos hemos encontrado en la interpretación de los resultados es la extrapolación, cuantitativa y cualitativa, de los efectos (probados en animales) al ser humano. A nivel general, los NMs pueden provocar sobre el sistema digestivo, reacciones inflamatorias (originando enfermedades tales como la Enfermedad de Crohn o la Colitis Ulcerosa) (6), la sensibilización desencadenando alergias alimentarias y enfermedades autoinmunes como LES, Esclerodermia y Artritis Reumatoide. Sin embargo, para llegar a estas conclusiones, se debe considerar la fabricación de los NMs, ya que pueden surgir impurezas en el proceso que afecten a su toxicidad final o tener recubrimientos

tensoactivos superficiales que cambien su condición de producto no peligroso a dañino o viceversa.

El efecto tóxico de las NPs sobre otros sistemas no alberga resultados tan evidentes como sobre el digestivo. Existen estudios contradictorios sobre su toxicidad en el sistema endocrino y reproductor (actuando como disruptores) (7), puesto que, al no haberse visto realmente alterada la función reproductora masculina y femenina tras su exposición a NPs, no se puede confirmar la hipótesis planteada. Parece más evidente la toxicidad de NPs sobre el sistema endocrino al revisar estudios *in vivo* e *in vitro* sobre su papel como posibles agentes causantes de la Diabetes Mellitus tipo 2, el Síndrome Metabólico y la Obesidad. Estos estudios se centran en la capacidad de NPs de alterar presuntamente la función de las células β pancreáticas provocando una resistencia a la insulina y un trastorno de la homeóstasis de la glucosa. En concreto, se han estudiado como posibles mecanismos relacionados con una menor sensibilidad a la insulina, el deterioro en la acción de la insulina celular, la interacción con receptores estrogénicos, las variaciones en las vías homeostáticas y la inflamación. Los ensayos realizados con ciertas dosis de NPs de TiO₂ muestran que estas partículas son capaces de provocar indirectamente una respuesta inflamatoria en macrófagos (liberando TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 α e IL-1 β) y por ello una resistencia a la insulina en las células Fao. Del mismo modo, pueden actuar directamente sobre las células hepáticas activando quinasas de estrés y dando lugar a una señalización anormal de la insulina y consecuentemente un deterioro en su acción.

El tema de la genotoxicidad requiere una mención aparte. Sabemos que los mecanismos por los cuales estas partículas pueden dañar las estructuras celulares y el DNA son los mecanismos productores de ROS, los cuales (por un proceso todavía no muy bien establecido) (27) serían capaces de provocar un estrés oxidativo, muerte celular, inhibición de la división celular e inflamación. La generación de estos radicales se produce, tanto a nivel mitocondrial como en el SRE. La implicación de los ROS generados por las NPs en la toxicidad celular y sobre el DNA se observa en múltiples estudios. Aunque el principal marcador estudiado *in vivo* e *in vitro* en genotoxicidad es el 8-OHdG, también se ha comprobado relación entre peroxidación lipídica secundaria a ROS y mutaciones sobre el DNA.

Dentro de las CoNPs en particular (que tienen una gran importancia en el campo de la medicina) nos encontramos con los mismos fenómenos descritos en NPs con anterioridad. Por tanto, disponemos de estudios *in vitro* en cuanto a daño en el DNA, transformación celular, generación de ROS y estrés oxidativo en la exposición a CoNPs o aleaciones de cobalto. Asimismo, disponemos de estudios *in vivo* capaces de establecer dicha relación entre genotoxicidad y presencia de CoNPs, por ejemplo, un estudio en el que se realizó una instilación intratraqueal de CoNPs en ratones transgénicos delta GPT, provocando, estrés oxidativo, inflamación pulmonar (siendo mayor con CoNPs que los daños provocados por partículas de cobalto de otro tamaño), proliferación celular y mutación del DNA (16), tanto en fase aguda como crónica. Pese a que está bien establecida la relación de estas NPs con la enfermedad pulmonar, no existe unanimidad en su efecto carcinogénico, aunque existen estudios *in vivo* (19) en los que aparecen

tumores mesenquimales malignos expuestos a CoNPs en comparación con su exposición a partículas finas.

Las prótesis, tanto de rodilla, cadera y hombro (que son ampliamente utilizadas en la actualidad) merecen una atención especial por las repercusiones que puedan tener en cuanto a genotoxicidad, carcinogénesis e inflamación, reacciones de hipersensibilidad y toxicidad sistémica (neurológica, cardíaca y tiroidea). Se ha observado que existen diferencias de genotoxicidad entre las prótesis de CoNPs o cromo-cobalto y las de elaboradas en partículas de tamaño micro. Estas discrepancias pueden explicarse, en gran parte, por su distinta absorción celular y localización intracelular post absorción (15). Las reacciones de hipersensibilidad producidas en las prótesis de CoNPs y aleaciones cromo-cobalto son fundamentalmente de tipo IV. En cuanto a la toxicidad sistémica asociada a prótesis de cadera, en el análisis de implantación de prótesis tipo MoM o CoM con base de CoNPs o NPs cromo-cobalto (20), se estudiaron tres tipos de efectos a distancia: neurológicos, cardíacos y tiroideos. Los estudios revelan que la afectación neurológica fue la que reportó más casos, relacionados con neuropatía periférica, toxicidad ocular y pérdida de audición neurosensorial. No obstante, el deterioro cognitivo no pareció estar afectado. La asociación de implantes y toxicidad cardíaca, por el contrario, no se encuentra bien relacionada, ya que los resultados son dispares (pudiendo ser la patología previa cardíaca o enfermedades predisponentes a cardiopatía factores de confusión en dicha relación). Aunque se pueden citar, dentro de la afectación cardíaca, la disnea de esfuerzo, disfunción sistólica global, disfunción diastólica, derrame pericárdico y miocardiopatía dilatada como las alteraciones principales secundarias a la exposición a NPs. El tercer órgano más dañado por toxicidad a distancia aparentemente fue el tiroides, reportándose casos de hipotiroidismo posterior a la colocación de los dispositivos de NPs de estos elementos.

Por último, se han revisado estudios relacionados con los posibles mecanismos de reparación celular tras la exposición a NPs. Los más importantes tratan de ensayar el NAC (28,31) como posible tratamiento profiláctico o postquirúrgico capaz de revertir los efectos nocivos de las NPs de cromo-cobalto (liberadas tras la colocación de una prótesis de cadera metálica). Otro posible agente de reparación celular es la melatonina (29) (aunque no hay demasiados estudios al respecto), exhibiendo propiedades que la convierten en una molécula mucho más potente que otros antioxidantes como la Vitamina E y C (30).

6. CONCLUSIONES

Los estudios *in vitro* han demostrado el daño oxidativo, las alteraciones epigenéticas y la citotoxicidad de las NPs, siendo las CoNPs más estudiadas que las de otros metales de transición. Los estudios *in vivo* también reproducen estos resultados, si bien son trabajos realizados sobre estirpes celulares.

En el estudio de las prótesis metálicas se ha visto que la inclusión de NPs_{Co-Cr} resulta bastante aceptable en relación con su toxicidad, aunque es necesario realizar más estudios comparativos y epidemiológicos para establecer una mayor seguridad.

Por último, la investigación en nuevos métodos de obtención de NPs es un camino importante para reducir la toxicidad, como se ha visto con los procesos de obtención a baja temperatura y recubrimiento.

7. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor, el Dr. Iñigo Casafont Parra, toda la ayuda que me ha prestado en la elaboración y supervisión del trabajo, pero, sobre todo, me gustaría reconocer su calidad como persona y la cercanía que ha mostrado en todo momento en la resolución de los problemas.

En segundo lugar, quisiera agradecer a la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria la posibilidad de presentar este Trabajo de Fin de Grado y de poder graduarme próximamente con ellos.

Por último, pero no menos importante, deseo recordar en estas líneas, a toda mi familia, amigos y, en especial a mi hijo, porque gracias a todos ellos he podido llegar hasta aquí.

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) *Recomendación de la Comisión, de 18 de octubre de 2011, sobre la definición de nanomaterial 2011/696 / UE. Apagado. J. Eur. Union L. 27, 38–40.*
- (2) *Weissig V, Pettinger TK, Murdock N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. International journal of nanomedicine. 2014.*
- (3) *M^a José Zafra Barranco. INVASSAT. Institut Valencià de Seguretat i Salut en el Treball. Utilización nanomateriales. Terminología utilizada. Territorial de INVASSAT. Burjasot (Valencia) 13 de junio 2013.*
- (4) *Ávalos Fúnez A, Haza Duaso AI, Morales Gómez P. Nanotecnología en la industria alimentaria I: aplicaciones. Rev Complut Ciencias Vet. 2016.*
- (5) *Ávalos Fúnez A, Haza Duaso AI, Morales Gómez P. Nanotecnología en la industria alimentaria II: evaluación del riesgo y legislación. Rev Complut Ciencias Vet. 2016.*
- (6) *Martirosyan A, Schneider YJ. Engineered nanomaterials in food: Implications for food safety and consumer health. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2014.*
- (7) *Priyam A, Singh PP, Gehlout S. Role of Endocrine-Disrupting Engineered Nanomaterials in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. Front Endocrinol (Lausanne). 2018.*
- (8) *Yang Y, Westerhoff P. Presence in, and release of, nanomaterials from consumer products. Adv Exp Med Biol. 2014.*

- (9) Higuchi Y, Seki T, Morita D, Komatsu D, Takegami Y, Ishiguro N. Comparison of wear rate between ceramic-on-ceramic, metal on highly cross-linked polyethylene, and metal-on-metal bearings. *Rev Bras Ortop.* 2019.
- (10) Chattopadhyay S, Dash SK, Tripathy S, Pramanik P, Roy S. Phosphonomethyl iminodiacetic acid-conjugated cobalt oxide nanoparticles liberate Co⁺⁺ ion-induced stress associated activation of TNF- α /p38 MAPK/caspase 8-caspase 3 signaling in human leukemia cells. *J Biol Inorg Chem.* 2015.
- (11) Veiga-Álvarez Á, Sánchez-de-Alcázar D, Martínez-Negro M, Barbu A, González-Díaz JB, Maquea-Blasco J. Riesgos para la salud y recomendaciones en el manejo de nanopartículas en entornos laborales. *Med Segur Trab (Madr).* 2015.
- (12) Taghavi SM, Momenpour M, Azarian M, Ahmadian M, Souri F, Taghavi SA, et al. Effects of Nanoparticles on the Environment and Outdoor Workplaces. *Electron physician.* 2013.
- (13) Bundschuh M, Filser J, Lüderwald S, McKee MS, Metreveli G, Schaumann GE, et al. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? *Environmental Sciences Europe.* 2018.
- (14) Kirkland D, Brock T, Haddouk H, Hargeaves V, Lloyd M, Mc Garry S, et al. New investigations into the genotoxicity of cobalt compounds and their impact on overall assessment of genotoxic risk. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015.
- (15) Lison D, van den Brule S, Van Maele-Fabry G. Cobalt and its compounds: update on genotoxic and carcinogenic activities. *Critical Reviews in Toxicology.* 2018.
- (16) Wan R, Mo Y, Zhang Z, Jiang M, Tang S, Zhang Q. Cobalt nanoparticles induce lung injury, DNA damage and mutations in mice. *Part Fibre Toxicol.* 2017.
- (17) Annangi B, Bach J, Vales G, Rubio L, Marcos R, Hernández A. Long-term exposures to low doses of cobalt nanoparticles induce cell transformation enhanced by oxidative damage. *Nanotoxicology.* 2015.
- (18) Papageorgiou I, Brown C, Schins R, Singh S, Newson R, Davis S, et al. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials.* 2007.
- (19) Magaye R, Zhao J, Bowman L, Ding M. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles (Review). *Exp Ther Med.* 2012.
- (20) Bradberry SM, Wilkinson JM, Ferner RE. Systemic toxicity related to metal hip prostheses. *Clinical Toxicology.* 2014.

- (21) Posada OM, Tate RJ, Grant MH. Effects of CoCr metal wear debris generated from metal-on-metal hip implants and Co ions on human monocyte-like U937 cells. *Toxicol Vitro*. 2015.
- (22) Brown C, Lacharme-Lora L, Mukonoweshuro B, Sood A, Newson RB, Fisher J, et al. Consequences of exposure to peri-articular injections of micro- and nano-particulate cobalt-chromium alloy. *Biomaterials*. 2013.
- (23) Xia Z, Ricciardi BF, Liu Z, von Ruhland C, Ward M, Lord A, et al. Nano-analyses of wear particles from metal-on-metal and non-metal-on-metal dual modular neck hip arthroplasty. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2017.
- (24) Ansari SM, Bhor RD, Pai KR, Sen D, Mazumder S, Ghosh K, et al. Cobalt nanoparticles for biomedical applications: Facile synthesis, physiochemical characterization, cytotoxicity behavior and biocompatibility. *Appl Surf Sci*. 2017.
- (25) Fox KA, Phillips TM, Yanta JH, Abesamis MG. Fatal cobalt toxicity after total hip arthroplasty revision for fractured ceramic components. *Clin Toxicol*. 2016.
- (26) Ladon D, Doherty A, Newson R, Turner J, Bhamra M, Case CP. Changes in metal levels and chromosome aberrations in the peripheral blood of patients after metal-on-metal hip arthroplasty. In: *Journal of Arthroplasty*. 2004.
- (27) Dayem AA, Hossain MK, Lee S Bin, Kim K, Saha SK, Yang GM, et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017.
- (28) Liu YK, Yang HW, Wang MH, Wang W, Liu F, Yang HL. N-acetylcysteine Attenuates Cobalt Nanoparticle-Induced Cytotoxic Effects through Inhibition of Cell Death, Reactive Oxygen Species-related Signaling and Cytokines Expression. *Orthop Surg*. 2016.
- (29) Liu Y, Yang X, Wang W, Wu X, Zhu H, Liu F. Melatonin counteracts cobalt nanoparticle-induced cytotoxicity and genotoxicity by deactivating reactive oxygen species-dependent mechanisms in the NRK cell line. *Mol Med Rep*. 2017.
- (30) Liu Y, Hong H, Lu X, Wang W, Liu F, Yang H. L-Ascorbic Acid Protected Against Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Induced by Cobalt Nanoparticles Through ROS Attenuation. *Biol Trace Elem Res*. 2017.
- (31) Lee YH, Su S Bin, Huang CC, Sheu HM, Tsai JC, Lin CH, et al. N-acetylcysteine attenuates hexavalent chromium-induced hypersensitivity through inhibition of cell death, ROS-related signaling and cytokine expression. *PLoS One*. 2014.
- (32) Armstead AL, Li B. Nanotoxicity: Emerging concerns regarding nanomaterial safety and occupational hard metal (WC-Co) nanoparticle exposure. *International Journal of Nanomedicine*. 2016.

- (33)** Schwalfenberg GK, Genuis SJ. *Vitamin D, essential minerals, and toxic elements: Exploring interactions between nutrients and toxicants in clinical medicine. Sci World J.* 2015.